

Zentrum für Innere Medizin, Klinik II,  
Abteilung für Gastroenterologie, Endokrinologie und Stoffwechselkrankheiten

# **Tierexperimentelle Studien zur Übertragung der murinen Autoimmunpankreatitis durch adoptiven Zelltransfer**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizinwissenschaften  
(doctor rerum humanarum, Dr. rer. hum.)  
der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von  
M. Sc. Luise Ehlers (geb. Borufka)  
geboren am 08.07.1990 in Halle an der Saale

Rostock, April 2018

urn:nbn:de:gbv:28-diss2018-0159-4

**Dekan:** Prof. Dr. med. univ. Emil C. Reisinger

**1. Gutachter:** **Prof. Dr. med. habil. Robert Jaster**  
Klinik für Innere Medizin II, Abteilung für Gastroenterologie,  
Endokrinologie und Stoffwechselkrankheiten,  
Universitätsmedizin Rostock

**2. Gutachter:** **Prof. Dr. med. habil. Brigitte Vollmar**  
Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie,  
Universitätsmedizin Rostock

**3. Gutachter:** **Prof. Dr. med. Matthias Löhr**  
Department for Clinical Science, Intervention and Technology,  
Karolinska Universitetssjukhuset, Stockholm, Schweden

**Datum der Verteidigung:** 23. Oktober 2018

Für meine Familie

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Einleitung .....</b>	<b>3</b>
2.1 Übersicht über die Erkrankungen des exokrinen Pankreas .....	3
2.1.1 Chronische Pankreatitis .....	5
2.2 Autoimmunpankreatitis .....	7
2.2.1 Die zwei Typen der AIP .....	8
2.2.2 AIP Typ 1 als Teil der <i>IgG4-related disease</i> .....	9
2.3 Pathogenese der AIP .....	9
2.3.1 Die zelluläre Immunantwort bei der AIP .....	10
2.4 Tiermodelle der AIP .....	13
2.4.1 Das MRL/MpJ-Mausmodell .....	13
2.4.2 Transferversuche .....	15
2.5 Zielstellung der Arbeit .....	16
<b>3. Methoden .....</b>	<b>17</b>
3.1 Der Mausstamm .....	17
3.2 Allgemeiner, experimenteller Ablauf der Transferversuche .....	17
3.3 Einteilung der Transfergruppen .....	18
3.4 Die Spendertiere .....	19
3.4.1 Alter der Spendertiere .....	19
3.4.2 Entnahme der Organe der Spendertiere .....	20
3.5 Zellkulturmethoden .....	21
3.5.1 Zellkulturmedien .....	21
3.5.2 Gewinnung und Kultivierung von Milzzellen für den Transfer von CD3 <sup>+</sup> , CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> , CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> und CD4 <sup>+</sup> CD44 <sup>high</sup> T-Zellen .....	22
3.5.3 Isolation von CD3 <sup>+</sup> , CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> , CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> und CD4 <sup>+</sup> CD44 <sup>high</sup> T-Zellen .....	22
3.5.4 Gewinnung, Isolation und Expansion von CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> T-Zellen .....	24
3.5.5 Gewinnung von KM-Zellen und <i>in vitro</i> Generierung von dendritischen Zellen ....	25
3.5.6 Beurteilung der Isolationsqualität mittels Durchflusszytometrie .....	26
3.6 Adoptiver Zelltransfer .....	27
3.6.1 Versuchsende und Organentnahme .....	28
3.7 Histologische Methoden .....	28
3.7.1 H&E-Färbung .....	28

---

3.7.2	Immunhistochemie .....	30
3.7.3	Der AIP-Score des Pankreas .....	31
3.8	Statistische Auswertung .....	32
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>33</b>
4.1	Ausgewachsene MRL/MpJ-Mäuse entwickeln spontan eine AIP .....	33
4.2	Die Isolation der Zellen führte zu reinen Zellpopulationen .....	35
4.2.1	Reinheit der <i>in vitro</i> generierten DZs .....	37
4.3	Milzzellen, CD3 <sup>+</sup> und CD4 <sup>+</sup> CD44 <sup>high</sup> T-Zellen übertragen eine murine AIP .....	38
4.3.1	Transfer von Milzzellen, CD3 <sup>+</sup> , CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> und CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen .....	38
4.3.2	Transfer von Milzzellen und CD4 <sup>+</sup> CD44 <sup>high</sup> T-Zellen .....	40
4.4	Die Zusammensetzung der autoimmunen Herde verändert sich durch den Transfer verschiedener T-Zell-Subpopulationen nicht .....	41
4.5	Der Transfer von Milzzellen und CD3 <sup>+</sup> T-Zellen induziert keine Infiltration von Immunzellen in Lebern und Nieren .....	44
4.6	Der Transfer von CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Tregs verhindert die Progression der AIP nicht .....	45
4.7	Der Transfer von DZs führt nicht zu einer Induktion der murinen AIP .....	46
4.8	Hinweis zur Veröffentlichung der dargestellten Ergebnisse .....	47
<b>5.</b>	<b>Diskussion und Schlussfolgerungen .....</b>	<b>48</b>
5.1	Adoptiver Transfer verschiedener Zellpopulationen .....	49
5.1.1	Anzeichen der AIP bei MRL/MpJ-Mäusen .....	49
5.1.2	Transfer von Milzzellen .....	51
5.1.3	Transfer von CD3 <sup>+</sup> , CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> und CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen .....	53
5.1.4	Transfer von CD4 <sup>+</sup> CD44 <sup>high</sup> T-Zellen .....	55
5.1.5	Transfer von Tregs .....	56
5.1.6	Transfer von DZs .....	57
5.2	Limitationen des verwendeten Transfermodells bei MRL/MpJ-Mäusen .....	58
5.2.1	Weitere Komponenten des Immunsystems .....	60
5.3	Einordnung der vorliegenden Arbeit in den Stand der Forschung .....	61
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>63</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>I</b>
7.1	Abkürzungsverzeichnis .....	I
7.2	Tabellenverzeichnis .....	V
7.3	Abbildungsverzeichnis .....	V
7.4	Materialien .....	VI

7.4.1	Geräte.....	VI
7.4.2	Verbrauchsmaterialien.....	VII
7.4.3	Substanzen, Lösungen und Puffer .....	VIII
7.5	Curriculum Vitae .....	X
7.6	Liste der Publikationen und Fachvorträge auf Tagungen.....	XII
7.7	Danksagung .....	XIV
7.8	Eidesstattliche Erklärung.....	XV

## 1. Zusammenfassung

Die Autoimmunpankreatitis (AIP) ist eine Sonderform der chronischen Pankreatitis und im klinischen Alltag vor allem durch ihre Differenzialdiagnose zum Pankreaskarzinom und die gleichzeitig schwierige Diagnose wichtig. Die AIP zeichnet sich durch Immunzellinfiltrate und eine storiforme Fibrose im Azinusgewebe aus. Zusätzlich treten erhöhte IgG4-Serumspiegel (AIP Typ 1) oder granulozytäre Infiltrate im Gangepithel (AIP Typ 2) auf. Die AIP Typ 1 wird neuerdings auch als pankreatische Manifestation der IgG4-*related disease* angesehen.

Die Pathogenese der AIP ist noch zu großen Teilen unbekannt. Die Rolle der humoralen Immunantwort rückte durch die Entdeckung einiger auto-Antikörper (zum Beispiel gegen die Carboanhydrase II oder Lactoferrin) in den Fokus der Forschung. Die Spezifität der Antikörper und deren Beitrag zum Krankheitsgeschehen sind allerdings unklar. Die zelluläre Immunität bei der AIP ist vermutlich durch ein Ungleichgewicht von Typ 1 und Typ 2 T-Helferzellen geprägt. Antigen-präsentierende dendritische Zellen können durch die Produktion von Zytokinen ebenfalls direkt oder indirekt durch die Induktion von T-Helferzellen zur Pathogenese beitragen. Immunsuppressive regulatorische T-Zellen hemmen normalerweise die Immunantwort der T-Lymphozyten und weisen bei der AIP möglicherweise eine verminderte Funktion auf.

Die vorliegende Arbeit sollte neue Erkenntnisse auf dem Feld der zellulären Immunantwort liefern. Dazu wurden verschiedene T-Lymphozyten-Subpopulationen und dendritische Zellen von an AIP erkrankten weiblichen auf gesunde susceptible MRL/MpJ-Mäuse übertragen. Der MRL/MpJ-Mausstamm hat sich als Modell dieser Erkrankung etabliert, da vor allem weibliche Tiere dieses Stammes ab einem Alter von etwa 24 Wochen spontan eine AIP entwickeln, die der humanen AIP Typ 1 ähnelt. Durch die Gabe von Interferon- $\gamma$  oder Poly I:C kann die Krankheit bei den Tieren zusätzlich verstärkt werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass unaufgereinigte Milzzellen, die aus erkrankten Weibchen gewonnen und auf gesunde MRL/MpJ-Empfängertiere transferiert wurden, die murine AIP wirksam übertragen können. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Erkenntnisse durch den Transfer von *einzelnen* Zellpopulationen ausgeweitet. Die Beurteilung der Schwere der murinen AIP erfolgte mittels eines semi-quantitativen Scorings der Immunzellinfiltrate im Pankreasgewebe.

Milzzellen und CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten übertrugen die murine AIP bei MRL/MpJ-Mäusen effektiv, während CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten einzeln dazu nicht in der Lage

waren. Auch der Transfer von Milzzellen aus „gesunden“ Spendertieren beziehungsweise auf männliche Empfängertiere übertrug die Erkrankung nicht. Ebenso waren dendritische Zellen unter den gegebenen Bedingungen keine Überträger der AIP. Bemerkenswert war, dass der Transfer von  $CD4^+CD44^{high}$  Gedächtnis-T-Zellen die AIP genauso effektiv übertrug wie der Transfer von  $CD3^+$  T-Zellen, obwohl die Anzahl der transferierten Gedächtnis-T-Zellen geringer war. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Zusammensetzung der Immunzellinfiltrate im Pankreasgewebe durch den Transfer der verschiedenen T-Lymphozyten-Subpopulationen nicht beeinflusst wurde. Außerdem kam es durch den Transfer von Milzzellen und  $CD3^+$  T-Zellen nicht zu einem vermehrten Auftreten von Immunzellinfiltraten in der Leber oder den Nieren der Tiere. In einem abgewandelten Versuchsaufbau wurden zusätzlich die Effekte von regulatorischen T-Zellen auf die Progression der Erkrankung überprüft. Unter den gegebenen experimentellen Bedingungen hatten die regulatorischen T-Zellen allerdings keine signifikant suppressive Wirkung auf die murine AIP bei MRL/MpJ-Mäusen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf eine Schlüsselrolle von T-Zell-vermittelten Prozessen in der Pathogenese der AIP bei MRL/MpJ-Mäusen hin. Besonders interessant waren die Erkenntnisse über die wirkungsvolle Übertragung der Erkrankung durch den Transfer von  $CD4^+CD44^{high}$  Gedächtnis-T-Zellen, die eigene Ergebnisse der Arbeitsgruppe bestätigen: genetische Analysen an einer *Advanced Intercross Line* zur Kartierung sogenannter *Quantitative Trait Loci* deuteten auf eine Beteiligung der Gedächtnis-T-Zellen an der Pathogenese der AIP hin. Diese Zellpopulation besitzt möglicherweise eine gesteigerte Erinnerungsfunktion gegenüber körpereigenen Antigenen und trägt so durch eine vermehrte Produktion von Zytokinen eventuell zu dem Ungleichgewicht der T-Helferzellen bei.

In weiterführenden Studien könnten funktionelle Analysen diese Hypothese bestätigen. Außerdem würden Untersuchungen des komplexen Zusammenspiels zwischen zellulärer und humoraler Immunantwort das Verständnis des Krankheitsgeschehens erweitern.



## 2. Einleitung

Im Jahr 2016 wurden in Deutschland 79 Fälle pro 100 000 Einwohner registriert, die mit einer akuten oder einer chronischen Entzündung der Bauchspeicheldrüse (Pankreas) einhergingen [1]. Eine der zwei Hauptaufgaben des Pankreas ist die exokrine Produktion von Verdauungsenzymen in den Azinuszellen. Die Azinuszellen sind in Azini angeordnet, in denen die enzymproduzierenden Zellen die Ausführungsgänge des Pankreas umschließen. Die Verdauungsenzyme werden als Sekret direkt in die Pankreasgänge abgegeben, welche sich schließlich zu Hauptausführungsgängen mit Mündung in den Zwölffingerdarm zusammenschließen. Die Enzyme gelangen so direkt in den Verdauungstrakt, wo sie zur Spaltung der einzelnen Komponenten des Nahrungsbreis beitragen. Das Pankreas produziert hauptsächlich Vorstufen von eiweißspaltenden Enzymen, wie z.B. Trypsinogen, Chymotrypsinogen und Proelastase, aber auch fettsplattende Lipasen und stärke-spaltende Enzyme, wie die  $\alpha$ -Amylase. Die Proenzyme werden durch verschiedene Mechanismen erst im Darm aktiviert, um den Selbstverdau der Bauchspeicheldrüse zu verhindern. Störungen der exokrinen Funktion der Drüse gehen daher unter anderem mit Verdauungsstörungen einher.

Die zweite Funktion des Pankreas ist die endokrine Produktion von Hormonen in den Zellen der Langerhans-Inseln (Inselzellen). Diese bestehen aus verschiedenen Zellarten, die jeweils für die Produktion bestimmter Hormone zuständig sind. So produzieren unter anderem  $\beta$ -Zellen Insulin,  $\alpha$ -Zellen Glucagon und  $\delta$ -Zellen Somatostatin. Die produzierten Hormone dienen vorrangig der Kontrolle des Blutzuckerspiegels und werden direkt in das Blut sezerniert. Eine Störung dieser Funktion führt zu einem Diabetes mellitus, bei dem durch einen Insulinmangel oder eine Insulinresistenz ein chronisch erhöhter Blutzuckerspiegel vorliegt.

### 2.1 Übersicht über die Erkrankungen des exokrinen Pankreas

Beide Organstrukturen, die exokrine und die endokrine, können von Krankheiten betroffen sein. Verhältnismäßig selten kann es zu Fehlbildungen des gesamten Organs kommen. Des Weiteren können Pankreaszysten und -pseudozysten auftreten. Während die Pankreaszysten meist beschwerdefrei bleiben, treten Pseudozysten auch sekundär nach einer anderen Vorerkrankung auf und führen dann, im Falle einer Infektion, zu Fieber und anderen Entzündungsanzeichen.

Neoplastische Veränderungen des Pankreas sind oftmals bösartig und gehen zu über 95 % von den Epithelzellen der exokrinen Pankreasgänge aus [2]. Die meisten dieser exokrinen Pankreaskarzinome sind pankreatische duktale Adenokarzinome (PDAC). PDAC ist vor

allem eine erworbene genetische Erkrankung, bei der somatische Genmutationen akkumulieren und so letztendlich zu der malignen Veränderung führen. Es kommt zu prämaligen Läsionen der Pankreasgänge, wie den sogenannten *pancreatic intraepithelial neoplasia* (PANINs) [2, 3], aus denen schließlich das PDAC entsteht [2]. Bei 95 % der PDAC treten Mutationen in dem Onkogen *v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog* (*KRAS*) auf [3]. Zusätzlich sind vor allem Mutationen in den Tumorsuppressorgen *tumor protein p53* (*TP53*), *mothers against decapentaplegic homolog 4* (*SMAD4*) und *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A* (*CDKN2A*) ausschlaggebend [4]. Die Mutationen führen zu Kontrollverlusten der entsprechenden Genprodukte: *KRAS* (eine GTPase) wird dauerhaft aktiviert und induziert so permanent verschiedene Signalwege, die das Zellwachstum stimulieren [5]. *P53* verliert seine Funktion und kann so weder den Zellzyklus zur DNA-Reparatur stoppen, noch die Apoptose einleiten [6, 7]. *SMAD4* ist ein Transkriptionsfaktor, der eine Schlüsselrolle im *transforming growth factor* (TGF)- $\beta$ -Signaltransfer einnimmt. Mutationen in diesem Gen führen zu einer Unterbrechung der TGF- $\beta$ -Signalwege und damit zu einem Wegfall der anti-proliferativen Wirkung des Zytokins [8]. Andere Effekte des TGF- $\beta$ , wie immunsuppressive oder pro-angiogenetische Wirkungen hingegen, bleiben erhalten und fördern das Tumorwachstum zusätzlich [9]. *P16* und *P14ARF* sind Genprodukte von *CDKN2A* und regulieren den Zellzyklus [10]. Bei Mutation von *CDKN2A* ist diese Funktion gestört und die betroffenen Zellen können sich unkontrolliert teilen [11].

Die zweithäufigste Tumorerkrankung des exokrinen Pankreas ist das Azinuszellkarzinom, bei dem es häufig zu einer Überproduktion einzelner Verdauungsenzyme kommt. Muzinöszystische Neoplasien (MZN) und gutartige intraduktale papillär-muzinöse Neoplasien (IPMN) gelten neben den PANINs ebenfalls als prämalige Vorläuferläsionen für das PDAC [3]. Tumorerkrankungen in den endokrinen Strukturen des Pankreas sind eher selten, aber prinzipiell möglich. Dabei handelt es sich um Entartungen einzelner hormonproduzierender Zellarten der Langerhans-Inseln, wie z.B. beim Insulinom oder dem Glucagonom.

Die Prognose für das PDAC, als häufigste Form der pankreatischen Tumorerkrankungen, ist mit einer relativen 5-Jahres-Überlebensrate von 5 % in den USA [3] und 10 % in Deutschland [12] ungünstig. In Deutschland werden für das Jahr 2020 insgesamt 20 600 neue Fälle von Krebserkrankungen des Pankreas erwartet [13].

Im exokrinen Pankreas kommt es neben neoplastischen Veränderungen häufig zu Entzündungen (Pankreatitis). Dabei wird zwischen der akuten und der chronischen Pankreatitis unterschieden. Die akute Pankreatitis (AP) setzt plötzlich ein und äußert sich

dann durch einen heftigen Oberbauchschmerz, der von Übelkeit und Erbrechen begleitet sein kann. Vermutlich ist eine frühzeitige Aktivierung von Trypsin innerhalb der Azinuszellen für die Pathogenese verantwortlich. Diese Aktivierung kann in einer nächsten Phase zu intrapankreatischen Entzündungen und bei einem schweren Verlauf in der Folge auch zu extrapankreatischen Entzündungen führen [14]. Der Verlauf der AP kann mild, moderat oder schwer sein, wobei die meisten Patienten einen milden Verlauf zeigen [15]. Bei einer schweren AP kann es zu Komplikationen, wie Pseudozysten oder Nekrosen, kommen, welche zu einer hohen Letalität der schweren AP führen [14, 15]. Die Therapie und Letalität der AP hängen in hohem Maße von dem eventuellen Ausfall anderer Organsysteme ab.

#### 2.1.1 Chronische Pankreatitis

Eine chronische Pankreatitis (CP) ist im Gegensatz zur AP durch eine langanhaltende Entzündung des Pankreas gekennzeichnet, bei der es zum fibrotischen Umbau des Gewebes kommen kann. Die CP tritt üblicherweise schubweise auf, mit teilweise langen beinahe symptomfreien Phasen. Während der akuten bzw. akut rezidivierenden Schübe ist ein gürtelförmig ausstrahlender Oberbauchschmerz das Leitsymptom. Eine rezidivierende AP gilt als Vorstufe der CP [16]. In der Folge kann während der „frühen CP“ nicht mehr klar zwischen akutem und chronischem Krankheitsverlauf unterschieden werden. Die eindeutige Detektion diagnostischer Marker kennzeichnet dann eine CP, welche im Verlauf zu einer *end-stage* CP wird, bei der ein irreversibler Umbau der Organgewebsstruktur stattfindet [16]. Durch den Funktionsverlust des exokrinen Pankreas (exokrine Pankreasinsuffizienz) ist die Verdauung des Nahrungsbreis unzureichend und es kommt zu einer Maldigestion mit Fettstühlen und Gewichtsverlust [17]. Im weiteren Verlauf ist häufig auch die endokrine Funktion gestört (endokrine Pankreasinsuffizienz), was zu einem sekundären Diabetes mellitus (Typ 3c) führen kann [17, 18].

Neben häufigen Komplikationen der CP, wie Pankreaspseudozysten oder Stenosen der Gallengänge, ist das Risiko, in der Folge an einem Pankreaskarzinom zu erkranken, bis zu 16-fach erhöht [19]. Die Inzidenz der CP wird weltweit zwischen 1,6 und 23 pro 100 000 Einwohner angegeben; die Prävalenz steigt [20]. Die Prognose der CP ist abhängig von der Schwere der Verlaufsform und dem Therapieansprechen der Patienten. Die 10-Jahres-Überlebensrate liegt bei 70 % [19].

Die Pathogenese der CP ist nicht vollständig geklärt. Die Entzündung wird vermutlich durch eine Aktivierung von Trypsinogen zu Trypsin in den Azinuszellen des Pankreas ausgelöst. Es werden unterschiedliche Gründe hierfür diskutiert, unter anderem eine direkte Schädigung der

Azinuszellen durch Alkohol [21] und dadurch ausgelösten oxidativem Stress [22]. Außerdem könnte es zu einer Stabilisierung von aktiviertem Trypsin durch eine verminderte Degradation kommen. Die vermehrte Anwesenheit von Trypsin führt zu einem Selbstverdau des Pankreas. Zur Pathogenese der CP existieren unterschiedliche Konzepte. Eine hohe Akzeptanz hat in den letzten Jahren die auf den Pathologen Günter Klöppel zurückgehende Nekrose-Fibrose-Theorie erlangt [22, 23]. Diese besagt, dass eine immer wiederkehrende Entzündung und damit einhergehende lokale Nekrosen des Pankreas zur Proliferation von Bindegewebe und schließlich zu Narbenbildungen innerhalb des Gewebes führen. Dadurch kommt es zu einer Obstruktion der pankreatischen Ausführungsgänge und in der Folge zu deren Stauung. Eine schwere Obstruktion wiederum führt zu einer Atrophie der Azinuszellen und einem bindegewebigem Umbau (Fibrose) des Organs. Diese Fibrose spielt wahrscheinlich eine aktive Rolle in der Krankheitsprogression, die in eine exokrine und endokrine Organinsuffizienz mündet.

Die Ursachen für eine CP sind vielfältig. Die TIGAR-O [24] und die M-ANNHEIM Klassifikationen [25] fassen die multifaktorielle Ätiologie der CP zusammen. TIGAR-O berücksichtigt dabei toxisch-metabolische, idiopathische, genetische und autoimmune Gründe sowie eine rezidivierende AP und obstruktive Ursachen für eine CP. Bei der M-ANNHEIM-Klassifikation wird zwischen Alkohol, Nikotin, nutritiven und hereditären Faktoren sowie Faktoren der efferenten Gangsysteme, immunologischen Faktoren und sonstigen seltenen und metabolischen Faktoren unterschieden. Als wichtigste Ursache wird sowohl in Deutschland als auch weltweit Alkoholmissbrauch angesehen [17, 19]. Zusätzlich scheint Rauchen die Progression der Erkrankung zu beschleunigen [19]. Auch eine Hyperkalzämie und eine Hyperlipidämie gelten als Risikofaktoren [19, 25]. Die rezidivierende AP und die möglicherweise damit einhergehende Obstruktion der Pankreasgänge wurde bereits als Ursache für eine CP diskutiert [16, 22, 23]. Genetische Ursachen sind ebenfalls bekannt: Mutationen im kationischen Trypsinogen (*PRSSI*)-Gen konnten in einen Zusammenhang mit dem Auftreten einer hereditären CP gebracht werden [26]. Die Entstehung von Pankreaskarzinomen ist mit dem Tragen dieser Mutation ebenfalls erhöht [19]. Auch Mutationen im Serinprotease-Inhibitor, Kazal-Typ-1 (*SPINK1*)-Gen konnten mit dem Auftreten einer CP assoziiert werden [19, 27], ebenso wie Mutationen im *cystic-fibrosis-transmembrane-conductance-regulator* (*CFTR*)-Gen [28] und im Chymotrypsin-C (*CTRC*)-Gen [29]. 2015 wurde mit der Beschreibung einer Mutation im Gallensalz-aktivierte Lipase (*carboxylester-lipase*, *CEL*)-Gen die erste Assoziation einer CP mit einem Gen außerhalb des Protease-Antiprotease-Systems hergestellt [30].

Alkoholmissbrauch ist ein unabhängiger Risikofaktor für eine CP [19]. Die weiteren Risikofaktoren summieren sich im Krankheitsverlauf und erhöhen so insgesamt das Risiko für eine CP [31].

Rund 30 % der CP-Patienten leiden an einer idiopathischen CP [19]. Die Anzahl ist rückläufig, da zunehmend konkrete Gründe identifiziert werden. Eine dieser eigenständigen Ätiologien der CP ist die autoimmune Entzündung des Pankreas [19, 22, 24, 25].

## **2.2 Autoimmunpankreatitis**

Die Autoimmunpankreatitis (AIP) wird als fibrotisch-entzündliche Erkrankung definiert und wurde 1961 das erste Mal als chronisch-entzündliche Sklerose des Pankreas beschrieben [32]. Bereits 1995 wurde dann das Konzept der autoimmunen Entzündung der Bauchspeicheldrüse eingeführt [33]. Eine Akzeptanz über den fernöstlichen Raum hinaus erlangte die AIP jedoch erst innerhalb der letzten zwei Jahrzehnte.

Heutzutage wird die AIP in zwei verschiedene Typen eingeteilt: AIP Typ 1 und AIP Typ 2 [34]. Die Typ 1 AIP wird auch als lymphoplasmazytäre sklerosierende Pankreatitis (LPSP) definiert und zeichnet sich in erster Linie durch erhöhte Serumspiegel des Immunglobulin (Ig)-G4 aus. Bei der idiopathischen gangzentrierten Pankreatitis (*idiopathic duct-centric pancreatitis*, IDCP) hingegen sind die IgG4-Spiegel nicht erhöht (AIP Typ 2). Stattdessen zeigen sich bei dieser Form der AIP Infiltrationen von neutrophilen Granulozyten in den Gängen (sogenannte *granulocytic epithelial lesions*, GELs). Gemeinsame histologische Merkmale beider AIP-Typen beinhalten periduktale Immunzellinfiltrate und storiforme Fibrose.

Für die richtige Diagnosestellung werden viele Parameter parallel berücksichtigt, die unter den sogenannten HISORT-Kriterien zusammengefasst werden [35]. Diese betrachten das Zusammenspiel von histologischen Besonderheiten (Immunzellinfiltrate), Auffälligkeiten in der Bildgebung, der Krankheitsbeteiligung anderer Organe und dem Ansprechen auf eine Steroidtherapie.

Klinisch relevant wird die AIP vor allem durch ihre Differenzialdiagnose zum Pankreaskarzinom [36]. Die Symptome beider Erkrankungen sind in der Klinik schwer zu unterscheiden, die Therapieansätze hingegen sind grundlegend verschieden: während beim Pankreaskarzinom der einzige kurative Ansatz eine komplette Resektion des Tumors ist [37], sprechen AIP-Patienten sehr gut auf eine Therapie mit Steroiden an [38–40].

Die klinische Datenlage zur AIP ist in asiatischen Ländern wie z.B. Japan besser als in Europa und Deutschland. So lag die Prävalenz für die AIP in Japan im Jahr 2011 bei 4,6 pro 100 000

Einwohner und die Inzidenz bei 1,4 pro 100 000 Einwohner [41]. Studien dieser Art liegen für Deutschland erst seit kurzem vor [42]: die Prävalenz der AIP lag in einer Kohorte von Patienten mit nicht-alkoholischer Pankreatitis bei 9 %, während die Inzidenz in Deutschland auf 0,29 pro 100 000 Einwohner geschätzt wird. Die Daten wurden teilweise anhand von retrospektiven Kohorten-Studien im Südwesten Deutschlands erhoben und extrapoliert.

### 2.2.1 Die zwei Typen der AIP

Wie bereits erwähnt, werden bei der AIP zwei Typen unterschieden [34, 40, 43]. Einige Charakteristika sind in Tabelle 1 vergleichend für beide Subtypen dargestellt. Typ 1 der AIP (LPSP) scheint häufiger in jungen, männlichen Patienten aufzutreten [44] und in asiatischen Ländern weiter verbreitet zu sein als in Europa [36]. Histologisch sind bei diesem Subtyp der autoimmunen Entzündung vorrangig Ansammlungen von Lymphozyten und IgG4-positiven Plasmazellen im pankreatischen Gewebe zu beobachten [45]. Auch die Serumspiegel des IgG4 sind bei diesen Patienten erhöht [40]. Zusätzlich zu den IgG4-positiven Plasmazellen werden bei diesem Subtyp auch vermehrt auto-Antikörper (AKs) detektiert. LPSP tritt oft gemeinsam mit entzündlichen Infiltraten in anderen Organen auf, wie z.B. in den Gallengängen und Nieren [36] oder verschiedenen Drüsengeweben [46].

**Tabelle 1. Einige Charakteristika von AIP Typ 1 und Typ 2 (modifiziert nach [45]).**

Subtyp der AIP	AIP Typ 1	AIP Typ 2
weitere Bezeichnungen	LPSP	IDCP
Prävalenz	Asien > EU	EU > Asien
Alter der Patienten	höheres Alter	niedrigeres Alter
Geschlechterverteilung	männlich > weiblich	männlich = weiblich
Histologie	IgG4-positive Plasmazellen	GELs
Serologie	hohe IgG4-Spiegel im Serum auto-AKs vorhanden	normale IgG4-Spiegel im Serum auto-AKs nicht vorhanden
<i>Other Organ Involvement</i>	Läsionen in Tränen- und Speicheldrüsen sklerosierende Cholangitis Nephritis retroperitoneale Fibrose	-
Therapieansprechen auf Steroide	+	+
Assoziation mit Colitis Ulcerosa	selten	+

AIP - Autoimmunpankreatitis, LPSP - lymphoplasmazytäre sklerosierende Pankreatitis, IDCP - idiopathisch gangzentrierte Pankreatitis, EU - Europäische Union, IgG4 - Immunglobulin G4, GELs - *granulocytic epithelial lesions*, AKs - Antikörper.

Im Gegensatz zur AIP Typ 1 tritt die AIP Typ 2 geschlechterunabhängig vor allem bei jüngeren Patienten auf. Außerdem ist die Häufigkeit in Europa höher als im asiatischen Raum. Die IgG4-Serumspiegel sind nicht erhöht und auch das Auftreten von auto-AKs ist nicht beschrieben [43]. Eine Besonderheit in der Histologie der IDCP ist das Auftreten von GELs, bei denen es zu Ansammlungen von neutrophilen Granulozyten zwischen den Gangepithelzellen kommt [40]. Infiltrationen von Immunzellen können ebenfalls auftreten; IgG4-positive Plasmazellen werden hingegen nur selten beobachtet [40]. Die Beteiligung von anderen Organen ist bei der AIP Typ 2 nicht beschrieben. Dafür ist eine Assoziation von IDCP und chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (vor allem Colitis Ulcerosa) bekannt [47].

### 2.2.2 AIP Typ 1 als Teil der IgG4-related disease

Die hohen IgG4-Spiegel und auch das Auftreten von Läsionen in anderen Organen bei der AIP Typ 1 haben kürzlich zu einem Umdenken bei der Klassifikation dieser Erkrankung geführt. Daher wird die AIP Typ 1 neuerdings auch als pankreatische Manifestation der sogenannten *IgG4-related disease* (IgG4-RD) angesehen [46]. Darunter versteht man eine chronisch fibrotisch-inflammatorische Krankheit, die von lymphoplasmazytären Infiltraten und vor allem einer Vielzahl an IgG4-positiven Plasmazellen begleitet wird [48]. Dadurch erklärt man sich die Beteiligung vieler Organe am Krankheitsbild der AIP Typ 1.

## **2.3 Pathogenese der AIP**

Die Pathogenese der AIP (unabhängig vom Subtyp) ist nicht vollständig verstanden. Sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunantwort konnten bisher mit der Entstehung der AIP in Verbindung gebracht werden [49]. Die humorale Immunantwort besteht hauptsächlich aus AKs, die von B-Lymphozyten produziert und direkt ins Blut abgegeben werden [50]. Bei der zellulären Immunantwort wird die Reaktion durch frei bewegliche oder ortsgebundene Immunzellen ausgelöst, wie z.B. dendritische Zellen (DZs) und T-Lymphozyten [51].

Im Bereich der autoimmunen Bauchspeicheldrüsenentzündung war besonders die humorale Seite der Immunantwort im Fokus der Forschung. Ein besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Detektion von auto-AKs gelegt. 2009 wurde ein auto-AK bei AIP-Patienten gefunden, der Homologien zu dem Plasminogen-Bindungsprotein (PBP) von *Helicobacter pylori* und zu der Ubiquitin Protein Ligase E3 Komponente N-Recognin 2 (UBR2) aufweist, welche in Azinuszellen exprimiert wird [52]. Unabhängige Bestätigungen dieses Befundes fehlen allerdings noch und auch als diagnostischer Marker eignet sich der AK offenbar nicht, da er ebenfalls bei Patienten mit Pankreaskarzinom gefunden wurde. Des Weiteren wurden hohe

Titer für auto-AKs gegen PRSS1 und Produkte des *SPINK1*-Gens in Patienten mit AIP beobachtet [53]. Auch AKs gegen die Carboanhydrase II, Lactoferrin [54] und nukleäre Antigene (antinukleäre AKs, ANAs) wurden nachgewiesen [55]. Ob diese auto-AKs allerdings eine Rolle in der Pathogenese der AIP spielen oder eher eine Begleiterscheinung sind, ist weiterhin ungeklärt. Das Vorhandensein von IgG4-positiven Plasmazellen sowie hohen IgG4-Spiegeln in Patientenblut sorgte für die Fokussierung der Forschung auf die humorale Immunität. Dennoch ist die Rolle von IgG4 in der Entstehung der Erkrankung selbst weitgehend unbekannt [49].

### 2.3.1 Die zelluläre Immunantwort bei der AIP

Obwohl T-Lymphozyten die dominierende infiltrierende Zellart in den erkrankten Geweben der AIP-Patienten sind, ist auch die Rolle der zellulären Immunität in der Pathogenese der AIP nicht hinreichend geklärt. Das Vorhandensein von vor allem *cluster of differentiation* (CD)-4- und CD8-positiven T-Lymphozyten in den Pankreata ist bekannt [45, 49, 56–58]. Besonders das Auftreten von CD4-positiven T-Helferzellen (Th) wurde beschrieben. CD4-positive T-Lymphozyten entwickeln sich dabei unter anderem aus naïven T-Zellen (Th0) zu Th1 und Th2 [45]. Ausschlaggebend dafür ist die Stimulation durch verschiedene Zytokine. Interleukin (IL)-12 fördert die Entstehung von Th1 [45], während die Entstehung von Th2 durch IL-4 gefördert wird [59]. Die Th wiederum produzieren ebenfalls Zytokine: Th1 sezernieren unter anderem IL-2, den *tumor necrosis factor* (TNF)- $\alpha$  und Interferon (IFN)- $\gamma$  [56, 58], welche weitere Immunzellen regulieren und Entzündungsprozesse anstoßen können. Th2 produzieren IL-4, -5, -6 und -10 [45], denen eher anti-inflammatorische Eigenschaften zugeschrieben werden. Ein Ungleichgewicht zwischen Th1 und Th2 wird als mögliche Ursache für die Entstehung der AIP vermutet [56]. Welche Zellart bei dem Ungleichgewicht überwiegt, wird allerdings kontrovers diskutiert. Eine Dominanz von Th1 gegenüber Th2 wurde mehrfach gezeigt [56, 57]. Außerdem wurde die gesteigerte Expression von IFN- $\gamma$  durch Th1 als Auslöser für eine AIP beschrieben [55]. Zusätzlich verschlimmerte eine Behandlung mit IFN- $\gamma$  bei Mäusen die autoimmune Entzündung der Bauchspeicheldrüse [58]. Auf der anderen Seite wurde im Zusammenhang mit der AIP auch das vermehrte Auftreten verschiedener Th2-fördernder Zytokine beschrieben [56, 59].

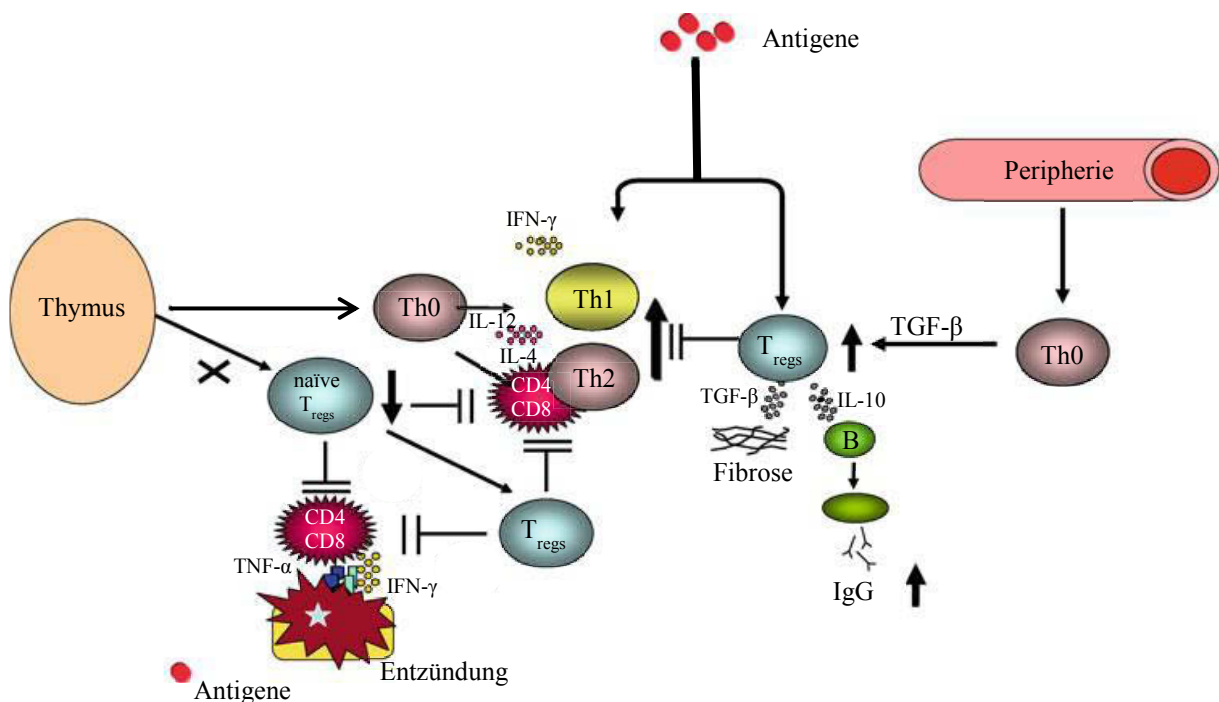
Die Rolle CD8-positiver zytotoxischer T-Lymphozyten in der AIP ist weitaus weniger intensiv untersucht. Studien legen allerdings nahe, dass CD8-positive T-Zellen an der Induktion einer Pankreatitis beteiligt sein könnten [60]. Bemerkenswert ist jedoch, dass auch im Rahmen von primär nicht als autoimmun angesehenen Verlaufsformen der CP der Anteil



an CD8-positiven T-Lymphozyten im Krankheitsverlauf zunimmt und somit der akute Entzündungsschub von T-Zell-vermittelten Prozessen abgelöst wird [61, 62]. Somit tragen Untersuchungen der CD8-positiven T-Zellen an der Rolle der Pathogenese der AIP gleichzeitig auch zum Verständnis späterer Formen der CP bei. In ihrer Funktion als Bestandteil der primären Immunantwort sezernieren zytotoxische T-Zellen ebenfalls Zytokine wie  $\text{TNF-}\alpha$  und  $\text{IFN-}\gamma$  und tragen so zum Entzündungsgeschehen bei.

Eine weitere entscheidende Rolle in der Pathogenese der AIP scheinen regulatorische T-Lymphozyten ( $T_{\text{regs}}$ ) zu spielen. CD4-positive  $T_{\text{regs}}$  entstehen ebenfalls aus Th0 [45] und haben immunsuppressive Eigenschaften durch die Produktion von IL-10 und  $\text{TGF-}\beta$  [59]. Die Beteiligung CD4CD25-doppelt-positiver  $T_{\text{regs}}$  am Geschehen einer AIP [63] und auch die gestörte Funktion der  $T_{\text{regs}}$  bei vielen autoimmunen Erkrankungen des Menschen konnten bereits gezeigt werden [59].

Auf Grundlage der bisherigen Erkenntnisse haben Okazaki *et al.* im Jahr 2011 eine Hypothese über die Pathogenese der AIP aufgestellt, welche 2014 nochmals überarbeitet wurde [45, 56].



**Abbildung 1. Hypothese über die Pathogenese der AIP (modifiziert nach [45]).** Es wird vermutet, dass der Beginn der Erkrankung durch eine verminderte Regulation der Th1 und Th2 initiiert wird, welche durch eine geringere Anzahl an  $T_{\text{regs}}$  zustande kommt. Dadurch produzieren vor allem Th1 pro-inflammatorische Zytokine. Im weiteren Verlauf regen dann sowohl  $T_{\text{regs}}$  als auch Th2 die Produktion von IgG4 durch B-Zellen an. Abkürzungen: B - B-Zelle, Th0 - naïve T-Zellen, Th1/2 - T-Helferzellen Typ 1/2,  $T_{\text{regs}}$  - regulatorische T-Zellen, CD - cluster of differentiation,  $\text{IFN-}\gamma$  - Interferon- $\gamma$ , IL - Interleukin,  $\text{TGF-}\beta$  - transforming growth factor  $\beta$ ,  $\text{TNF-}\alpha$  - tumor necrosis factor  $\alpha$ , Ig - Immunglobulin.

In Abbildung 1 sind die möglichen Vorgänge der Pathogenese der AIP in einer Übersicht zusammengefasst. Bei dem vorliegenden Konzept wird dabei grundlegend zwischen „Beginn der Erkrankung“ (linke Abbildungsseite) und „Progression der Erkrankung“ (rechte Abbildungsseite) unterschieden. CD4-positive (und weniger CD8-positive) Th1 und Th2 entstehen durch die Stimulation verschiedener Zytokine aus naïven Th0. Die Erkennung körpereigener Antigene (AGs) dieser Zellen wird normalerweise durch T<sub>regs</sub> verhindert. T<sub>regs</sub> entstehen in Anwesenheit von unter anderem TGF- $\beta$  ebenfalls aus naïven T-Lymphozyten. Bei der AIP könnte möglicherweise die Anzahl an naïven T<sub>regs</sub> vermindert sein, was dazu führt, dass die AG-Erkennung von Th1 und Th2 nicht mehr reguliert wird. Vor allem Th1 produzieren nach AG-Bindung pro-inflammatorische Zytokine wie IL-2, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ . Besonders dieser Schritt wird als Beginn der Krankheitsentstehung angesehen. Im weiteren Krankheitsverlauf könnte es zur vermehrten Induktion von T<sub>regs</sub> durch TGF- $\beta$  kommen, welche wiederum B-Lymphozyten zur Produktion von IgG4 anregen. Zusätzlich wird vermutlich die Entstehung von Th2 durch IL-4 gefördert, welche ebenfalls Zytokine produzieren und B-Lymphozyten zur AK-Produktion anregen. Außerdem wurde beschrieben, dass Th2 von der Peripherie in das lokale Gewebe migrieren, wo sie zur Progression der AIP beitragen können [57].

Trotz dieser Hypothese, deren Details teilweise durch Studien belegt wurden, sind die zellulären und molekularen Vorgänge in der Pathogenese nicht eindeutig geklärt und müssen weiter untersucht werden.

#### 2.3.1.1 Dendritische Zellen

Eine weitere Zellart der zellulären Immunantwort sind die dendritischen Zellen. DZs sind AG-präsentierende Zellen, die in besonders hohem Maße dazu in der Lage sind, T-Lymphozyten zu aktivieren. Die Aktivierung einer T-Zelle kann nur erfolgen, wenn die Präsentation des AGs über ein *major histocompatibility complex* (MHC)-Molekül und die gleichzeitige Bindung der T-Zelle an kostimulatorische Moleküle erfolgen.

DZs entstehen aus CD34-positiven hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark (KM) in Anwesenheit von IL-4 oder dem Granulozyten-Makrophagen-stimulierenden Faktor (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF) [64]. Die hämatopoetischen Stammzellen differenzieren ständig in lymphoide und myeloide Vorläuferzellen, aus denen verschiedene Arten DZs entstehen können: plasmazytoide DZs (pDZs), CD141-positive konventionelle DZs (kDZs) und CD1c-positive kDZs [65]. Davon abzugrenzen sind die von

Monozyten abgeleiteten DZs. Unterscheidbar sind diese verschiedenen DZ-Arten vor allem durch die verschiedenen Expressionen der Oberflächenmoleküle.

DZs liegen normalerweise als unreife Zellen vor und entwickeln nach Kontakt mit einem AG einen reifen Phänotyp. Den unreifen DZs fehlen die kostimulatorischen Oberflächenmoleküle CD40, CD80 und CD86. Außerdem exprimieren sie nur geringe Mengen an MHC-Molekülen. Die reifen Zellen exprimieren große Mengen an kostimulatorischen Molekülen und MHC [66]. Zusätzlich produzieren die Zellen Zytokine, wie z.B. IL-12 (kDZs) oder IFN- $\gamma$  (pDZs), was zur Differenzierung von Th1 bzw. zu Entzündungsreaktionen führt. Das Lipopolysaccharid (LPS) ist ein AG, was zur Aktivierung von DZs führt und bei *in vitro* Arbeiten zur Stimulation der dendritischen Zellen genutzt wird [67].

Es konnte bereits gezeigt werden, dass pDZs durch die Produktion von IFN- $\alpha$  eine Rolle in der Pathogenese der AIP spielen könnten [68]: eine Blockade von IFN- $\alpha$  oder das direkte Ausschalten der pDZs verhinderte eine Entstehung der AIP im Tiermodell. Auch bei AIP-Patienten konnten pDZs im Pankreas und erhöhte IFN- $\alpha$ -Serumspiegel nachgewiesen werden [68].

## **2.4 Tiermodelle der AIP**

Für die AIP sind mehrere Tiermodelle bekannt. Davidson *et al.* stellten 2005 eine experimentelle AIP in Ratten vor [69]: durch den adoptiven Transfer von Amylase-spezifischen CD4-positiven T-Lymphozyten war es möglich, eine autoimmune Entzündung im Pankreas hervorzurufen. Das Konzept ist nicht auf eine bestimmte Rattenart limitiert, sondern wurde erfolgreich in DA(RP)- und Lewis-Ratten angewendet [69]. Auch männliche Wistar Bonn/Kobori-Ratten entwickeln histologische und klinische Besonderheiten, die früher für eine CP gehalten wurden, aber neuerdings eher der AIP zugeordnet werden [70].

Abgesehen von den Rattenmodellen dienen hauptsächlich Mausmodelle der Erforschung der AIP. Eine murine AIP konnte unter anderem durch einen genetischen *Knockout* von TGF- $\beta$  in einem C57BL/6-Mausstamm ausgelöst werden [71]. Ebenso führte eine spezifische Überexpression von Lymphotoxin  $\alpha$  und  $\beta$  in Azinuszellen zu einer immunbasierten Pankreatitis [72].

### **2.4.1 Das MRL/MpJ-Mausmodell**

Es ist schon lange bekannt, dass MRL-Mäuse eine hohe Neigung zu Autoimmunität besitzen [73]. Speziell die MRL/MpJ-Mäuse sind ein etabliertes Modell zur Untersuchung der murinen AIP [74]. Der Vorteil dieses Mausmodells liegt darin, dass die Tiere spontan ab einem Alter

von ca. 24 Wochen Anzeichen einer AIP entwickeln [57, 58, 74, 75]. Die Inzidenz liegt dabei bei den weiblichen Tieren höher als bei den männlichen: 74 % der 34-38 Wochen alten Weibchen entwickeln eine AIP [74]. Männliche Tiere zeigen die Krankheitsanzeichen erst zu einem späteren Zeitpunkt und dann in einer mildereren Form [74, 75].

Die murine AIP ähnelt dem Bild einer humanen AIP Typ 1. Es treten vor allem CD4-positive Immunzellinfiltrate auf [74], aber keine GELs. Insgesamt scheint die Erkrankung auch bei Mäusen T-Zell-vermittelt zu sein. Eine Blockade des zytotoxischen T-Lymphozyten-assoziierten Proteins 4 (CTLA4), was zu einer reduzierten Bildung von T<sub>regs</sub> führt, hatte eine gesteigerte Aktivität von Effektor-T-Zellen zur Folge [57]. Mäuse sind zwar nicht in der Lage IgG4 zu produzieren, aber es konnte gezeigt werden, dass die Menge an Immunglobulin allgemein erhöht ist [73].

Das Krankheitsbild der murinen AIP kann durch die Gabe von *polyinosinic:polycytidylic* Säure (Poly I:C) verstärkt werden [76]. Poly I:C ist eine synthetisch hergestellte, doppelsträngige RNA, welche über den *toll-like receptor 3* (TLR3) AG-präsentierende Zellen aktivieren kann. Die Verstärkung der AIP äußert sich zum einen in einem schwereren Krankheitsbild und zum anderen in einer früheren Ausbildung der Erkrankungsanzeichen [57, 76]. Auch die Gabe von IFN- $\gamma$  sorgte bei den MRL/MpJ-Mäusen für einen schwereren Verlauf der AIP und eine höhere Inzidenz [58].

#### 2.4.1.1 Eigene Vorarbeiten der Arbeitsgruppe

In eigenen Vorarbeiten der Arbeitsgruppe um Prof. Jaster wurden verschiedene Erkenntnisse über das MRL/MpJ-Mausmodell gesammelt [57, 58, 75, 77–79]. In Kooperationsarbeiten wurde unter anderem gezeigt, dass weibliche MRL/MpJ-Mäuse im Vergleich zu männlichen Tieren eine altersabhängige Steigerung intrapankreatischer Lymphozyteninfiltrate aufweisen und zusätzlich funktionelle Verluste der Kapillarperfusion [75]. Als eine weitere grundlegende Arbeit ist die Etablierung einer *Advanced Intercross Line* (AIL) anzusehen, bei der vier verschiedene Mausstämme über mehrere Generationen miteinander verpaart wurden [77, 78]. Bei den vier Mausstämmen handelte es sich um einen Wildtyp-Stamm (Cast/EiJ-Mäuse), einen Stamm, der anfällig für eine Kollagen-induzierte Arthritis ist (BXD2-Mäuse), einen Modellstamm für Lupus Erythematosus (NZM-Mäuse) und den MRL/MpJ-Stamm. An Proben der verpaarten Tiere wurden genetische Analysen durchgeführt, um sogenannte *Quantitative Trait Loci* (QTLs) zu identifizieren. QTLs sind Abschnitte auf Chromosomen, die einen Einfluss auf ein bestimmtes, quantitatives (stetiges) Merkmal haben. Durch die Auswahl der Mausstämme wurden dabei nicht nur AIP-spezifische QTLs erwartet, sondern

auch *loci*, die generell mit Autoimmunität in Verbindung gebracht werden können [77]. In der vierten Generation der AIL konnten durch Genotyp-Phänotyp-Korrelationsanalysen 5 QTLs kartiert werden, die mit der Schwere der AIP assoziiert sind [77]. Die Anzahl der Gene innerhalb der QTLs ist sehr groß. Trotzdem konnten bereits einige Gene ausgemacht werden, die möglicherweise von Interesse für die Pathogenese der AIP sind. Unter anderem war das *C-type lectin domain family 4, member a2 gene (CLEC4A2)*-Gen in einem der QTLs angesiedelt [77]. Dieses Gen kodiert für einen Rezeptor, der hauptsächlich auf DZs exprimiert wird und so deren Expansion inhibieren kann [80]. Das grundlegende Interesse an AG-präsentierenden DZs im Kontext von autoimmunen Erkrankungen, aber auch das Vorkommen von *CLEC4A2* und weiteren DZ-assoziierten Genen in den QTLs, rechtfertigte eine grundlegende Charakterisierung von DZs am MRL/MpJ-Mausstamm. Dabei konnte gezeigt werden, dass *in vitro* generierte kDZs aus dem KM älterer MRL/MpJ-Mäuse einen reiferen Phänotyp aufweisen als die Zellen jüngerer Tiere und somit eventuell durch ein Ungleichgewicht in der Aktivierung der DZs am Krankheitsgeschehen der AIP beteiligt sind [79].

Weitere genetische Analysen der Generation 4 der AIL verdeutlichten, dass unter anderem CD4<sup>+</sup>/CD44<sup>high</sup> Gedächtnis-T-Zellen eine mögliche Rolle in der Pathogenese der AIP spielen: die relative Häufigkeit dieser Zellart korrelierte mit dem Auftreten einer AIP [78]. Außerdem überlappte das Auftreten von CD4<sup>+</sup>CD44<sup>high</sup> T-Zellen bei einer AIP mit einem QTL, der bei veränderten Genotyp-Phänotyp-Korrelationsanalysen dokumentiert wurde. Nur die Gedächtnis-T-Zellen konnten bei beiden Analysen identifiziert werden [78]. Dennoch erschienen bei den Einzelanalysen auch Hinweise auf andere T-Zellarten, die möglicherweise mit der Entstehung oder der Progression einer AIP in Verbindung gebracht werden können. Von besonderem Interesse waren dabei *Forkhead-Box-Protein P3* (FoxP3)-positive T<sub>regs</sub> [78]. Es konnte in MRL/MpJ-Mäusen gezeigt werden, dass FoxP3-positive Zellen bereits früh im Krankheitsverlauf in das betroffene pankreatische Gewebe einwandern [81]. Außerdem konnte durch Gabe von Rapamycin eine selektive Expansion von T<sub>regs</sub> hervorgerufen werden, welche in der Folge die T-Zellimmunantwort inhibierten und so den Verlauf der AIP bei MRL/MpJ-Mäusen verbesserten [57].

#### 2.4.2 Transferversuche

Eine wichtige Charakteristik von autoimmunen Erkrankungen ist die *in vivo* Übertragbarkeit der Erkrankung von betroffenen Individuen auf gesunde, aber suszeptible Tiere. Wie bereits erwähnt, konnte dieses für die experimentelle AIP bei Ratten erfolgreich nachgewiesen

werden [69]. Auch für das MRL/MpJ-Mausmodell wurden Transferversuche durchgeführt [74]. Kanno *et al.* isolierten dafür unaufgereinigte Milzzellen aus an AIP-erkrankten weiblichen MRL/MpJ-Mäusen und transferierten diese in weibliche und männliche Mäuse desselben Stammes. Die Weibchen entwickelten daraufhin Anzeichen einer Pankreatitis, die Männchen allerdings nicht [74]. Ähnliche Transferversuche mit dem Serum erkrankter Tiere führten nicht zu einer Übertragung der AIP [74].

## **2.5 Zielstellung der Arbeit**

Die beschriebene Datenlage deutet darauf hin, dass die zelluläre Immunität in der Entstehung und der Progression der AIP eine entscheidende Rolle spielen könnte. Die humorale Immunantwort hingegen scheint zumindest für die Entstehung der AIP entbehrlich zu sein. Allerdings fehlt immer noch ein detailliertes Verständnis der Abläufe der zellulären Immunantwort. Für die adoptiven Transferversuche bei MRL/MpJ-Mäusen wurden bisher nur Milzzellen mit allen darin enthaltenen Zellarten verwendet [74]. Milzzellen bestehen allerdings aus einer Vielzahl von verschiedenen Lymphozyten und so ist es durch die bisher durchgeführten Versuche nicht möglich, die für den Transfer verantwortliche Zellpopulation genauer einzugrenzen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, durch weitere adoptive Transferversuche mit verschiedenen T-Lymphozyten-Subpopulationen einen genaueren Einblick in die zellulären Mechanismen der autoimmunen Prozesse der murinen AIP zu erlangen.

Zu diesem Zweck wurde ebenfalls das MRL/MpJ-Mausmodell verwendet. Verschiedene T-Lymphozyten-Subpopulationen wurden aus erkrankten weiblichen Tieren des Stammes isoliert und auf gesunde Individuen übertragen. Zusätzlich wurden die Transferversuche auch mit DZs durchgeführt. Die Übertragung der einzelnen Zellpopulationen sollte es ermöglichen, diejenigen Zellarten zu identifizieren, die eine murine AIP übertragen oder aber inhibieren können.

### 3. Methoden

#### 3.1 Der Mausstamm

MRL/MpJ-Mäuse sind ein etablierter Mausstamm zur Erforschung der AIP, da vor allem weibliche Tiere dieses Stammes spontan eine AIP entwickeln. Ab einem Alter von ca. 24 Wochen weisen über 50 % der weiblichen Tiere Zeichen für eine murine AIP auf; ab 34 Wochen sind es sogar 74 % [74, 75].

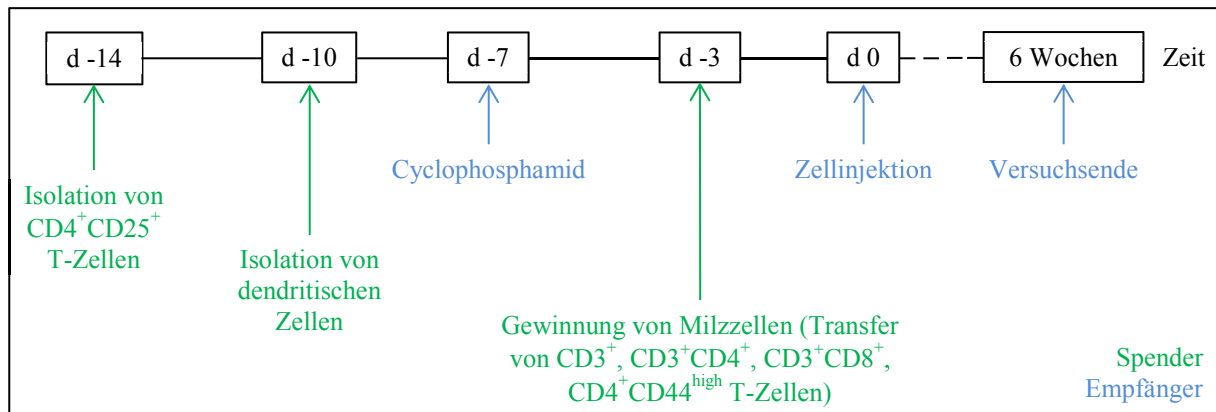
Für die *in vivo* Versuche wurden MRL/MpJ-Mäuse verschiedener Altersgruppen verwendet. Die Mäuse wurden bei Charles River Laboratories (Sulzfeld) gekauft. Die Haltung, Züchtung und Fütterung der Tiere erfolgte nach der Richtlinie der EU-Kommission *2010/63/EU zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere* in der Core Facility Zentrale Versuchstierhaltung der Universitätsmedizin Rostock. Die Mäuse wurden unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen gehalten, waren einem 12-Stunden Tag-Nacht-Rhythmus ausgesetzt und hatten jederzeit uneingeschränkten Zugang zu Futter und Wasser. Zusätzlich wurde während der 6-wöchigen Beobachtungszeit eingeweichtes Futter zur Verfügung gestellt.

#### 3.2 Allgemeiner, experimenteller Ablauf der Transferversuche

Grundsätzlich bestand der adoptive Zelltransfer aus einer Übertragung von Zellen AIP-erkrankter MRL/MpJ-Mäuse auf gesunde Tiere desselben Stammes, um eine eventuelle Übertragbarkeit der Erkrankung nachzuweisen. In den vorliegenden Versuchen wurden zu diesem Zweck Milzzellen,  $CD3^+$ ,  $CD3^+CD4^+$ ,  $CD3^+CD8^+$  und  $CD4^+CD44^{high}$  T-Zellen und DZs transferiert. Die Übertragung von  $CD4^+CD25^+$  T<sub>regs</sub> hingegen diente der Überprüfung der Hypothese, dass diese Zellart das Fortschreiten der Erkrankung verhindern kann. Dazu wurden Zellen aus MRL/MpJ-Mäusen mit einer beginnenden AIP auf Tiere der gleichen Altersgruppe übertragen. Die MRL/MpJ-Mäuse dienten bei beiden Herangehensweisen sowohl als Zellspender als auch als Zellempfänger. Ein durch das Land Mecklenburg-Vorpommern (Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern) genehmigter Tierversuchsantrag (Genehmigungsnummer: 7221.3-1-040/14) liegt vor.

Die Organentnahme für die Gewinnung von Zellen aus Spendertieren erfolgte zu drei verschiedenen Zeitpunkten, die den Zellkulturbedingungen der verschiedenen Zellarten angepasst waren (Abbildung 2). Der Ablauf für den Transfer von  $CD3^+$ ,  $CD3^+CD4^+$ ,  $CD3^+CD8^+$  und  $CD4^+CD44^{high}$  T-Zellen war dabei gleich: 3 Tage vor Zellinjektion wurden Milzzellen aus Spendertieren gewonnen und aus diesen am Tag der Zellinjektion die

verschiedene T-Lymphozyten-Subpopulationen isoliert. Die *in vitro* Generierung von DZs aus KM dauert 10 Tage [82], dementsprechend fand die Gewinnung von KM bereits 10 Tage vor Zellinjektion statt. Die Zellzahl isolierter  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen ist für den Transfer ungenügend, weshalb eine Expansion dieser Zellen über 14 Tage nötig ist [83]. Hierfür wurden 2 Wochen vor Transfer Milzzellen gewonnen, um am selben Tag daraus  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen zu isolieren und diese unter bestimmten Bedingungen zu kultivieren.



**Abbildung 2. Zeitlicher Ablauf der Zelltransferexperimente.** MRL/MpJ-Mäuse dienten als Zellspender und -empfänger. Die Zellen wurden zu 3 verschiedenen Zeitpunkten gewonnen: für den Transfer von regulatorischen T-Zellen wurden 14 Tage vor Injektion Milzzellen gewonnen und die  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen am selben Tag isoliert. Für den Transfer von dendritischen Zellen wurde 10 Tage vor Zellinjektion Knochenmark gewonnen und daraus unter spezifischen Kulturbedingungen dendritische Zellen generiert. Für den Transfer von  $CD3^+$ ,  $CD3^+CD4^+$ ,  $CD3^+CD8^+$  und  $CD4^+CD44^{high}$  T-Zellen erfolgte die Gewinnung von Milzzellen 3 Tage vor Injektion und die Isolation der Subpopulationen am Tag des Transfers. Alle Empfängertiere wurden 1 Woche vor Zellinjektion mit 200 mg/kg Körpergewicht Cyclophosphamid behandelt und 6 Wochen danach aufgearbeitet.

Die Empfängertiere wurden 7 Tage vor Zellinjektion mit 200 mg/kg Körpergewicht Cyclophosphamid vorbehandelt. Diese Manipulation erfolgte in Anlehnung an die Arbeiten von Kanno *et al.* [74] und soll das Ansiedeln der transferierten Zellen erleichtern. Nach der Zellinjektion wurden die Empfängertiere 1 Mal wöchentlich gewogen. Nach 6-wöchiger Beobachtungszeit erfolgte die Aufarbeitung der Tiere. Die Überprüfung des Schweregrades der AIP der Empfängertiere wurde an gefärbten Schnitten der Pankreata durchgeführt.

### 3.3 Einteilung der Transfergruppen

Der Transfer vieler verschiedener Immunzelltypen erforderte das Aufteilen der Versuchstiere in verschiedene Transfergruppen. Die Einteilung der Gruppen erfolgte hauptsächlich anhand der Art der transferierten Zellen. Zusätzlich wurden eine Kontrollgruppe und mehrere Vergleichsgruppen mitgeführt. Details zu den Gruppen sind in Tabelle 2 zu finden. Aufgelistet sind neben der Gruppennummer und der Art und Anzahl der transferierten Zellen



auch das Geschlecht und das Alter der jeweiligen Gruppen in Wochen  $\pm$  SEM. Bei den Spendertieren ist zusätzlich der AIP-Score ( $\pm$  SEM) angegeben; bei den Empfängertieren die Anzahl der einbezogenen Tiere.

**Tabelle 2. Eigenschaften der Transfergruppen.**

Gruppe	Spendertiere			Art der transferierten Zellen	Anzahl der transferierten Zellen	Empfängertiere		
	Geschlecht	Alter [Wochen $\pm$ SEM]	AIP-Score $\pm$ SEM			Geschlecht	Alter [Wochen $\pm$ SEM]	n
Kontrolle	-	-	-	-	-	weiblich	9,5 $\pm$ 0,5	10
1	weiblich	38 $\pm$ 0,6	3,0 $\pm$ 0,1	Milzzellen	5 x 10 <sup>6</sup>	männlich	8,7 $\pm$ 0,1	10
2	weiblich	8,5 $\pm$ 0,2	0,2 $\pm$ 0,2	Milzzellen	5 x 10 <sup>6</sup>	weiblich	8,5 $\pm$ 0,3	6
3	weiblich	40 $\pm$ 1,3	2,9 $\pm$ 0,2	Milzzellen	5 x 10 <sup>6</sup>	weiblich	9,3 $\pm$ 0,2	10
4	weiblich	44 $\pm$ 1,9	3,0 $\pm$ 0,2	CD3 <sup>+</sup> T-Zellen	5 x 10 <sup>6</sup>	weiblich	9,1 $\pm$ 0,3	10
5	weiblich	43 $\pm$ 1,8	2,9 $\pm$ 0,1	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen	5 x 10 <sup>6</sup>	weiblich	8,6 $\pm$ 0,3	10
6	weiblich	43 $\pm$ 1,9	2,9 $\pm$ 0,1	CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen	5 x 10 <sup>6</sup>	weiblich	8,1 $\pm$ 0,2	9
7	weiblich	37 $\pm$ 0,4	2,9 $\pm$ 0,1	Milzzellen	2 x 10 <sup>6</sup>	weiblich	9,0 $\pm$ 0,1	9
8	weiblich	39 $\pm$ 1,2	3,0 $\pm$ 0,2	CD4 <sup>+</sup> CD44 <sup>high</sup> T-Zellen	2 x 10 <sup>6</sup>	weiblich	8,6 $\pm$ 0,2	10
9	weiblich	56 $\pm$ 1,2	2,8 $\pm$ 0,1	dendritische Zellen	5 x 10 <sup>6</sup>	weiblich	8,6 $\pm$ 0,3	9
10	-	-	-	-	-	weiblich	29 $\pm$ 0,2	10
11	weiblich	27 $\pm$ 0,1	2,6 $\pm$ 0,2	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> T <sub>regs</sub>	2,5 x 10 <sup>6</sup>	weiblich	30 $\pm$ 0,2	8

Bei den Vergleichsgruppen (Gruppen 1-3, 7, 10) variierten das Alter der Spender- oder Empfängertiere, das Geschlecht der Empfängertiere und die Anzahl der transferierten Zellen im Vergleich zu den Versuchsgruppen (4-6, 8, 9, 11).

### 3.4 Die Spendertiere

#### 3.4.1 Alter der Spendertiere

Der Grundgedanke der Zelltransferversuche war eine Übertragung der AIP von kranken MRL/MpJ-Mäusen auf gesunde Tiere. Das MRL/MpJ-Mausmodell zeichnet sich durch eine spontane Ausbildung einer AIP in einem fortgeschrittenen Alter vor allem bei Weibchen aus [74]. Dementsprechend wurden weibliche MRL/MpJ-Mäuse mit einem durchschnittlichen Alter von 42  $\pm$  0,8 Wochen als Spendertiere gewählt, da dies die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer AIP erhöhte. Lediglich bei der Vergleichsgruppe 2 waren die weiblichen Spendertiere in einem jungen Alter (8,5  $\pm$  0,2 Wochen), in dem die Häufigkeit einer AIP gering ist. Die Spendertiere aus Versuchsgruppe 11 waren ebenfalls etwas jünger (27  $\pm$  0,1 Wochen), da der Effekt von regulatorischen T-Zellen im Verlauf der AIP getestet werden sollte und eine vollständige Ausprägung der Krankheit erst ab Woche 34 erwartet wird.

### 3.4.2 Entnahme der Organe der Spendertiere

Die Isolation der verschiedenen T-Lymphozyten-Subpopulationen erfolgte aus Milzzellen. Die Milzzellen eines Spendertieres wurden jeweils aus einer ganzen Milz gewonnen. Zusätzlich zur Milz wurden auch das Pankreas, Teile der Leber und die Nieren der Spendertiere entnommen, um eine umfassende Krankheitsbeurteilung des jeweiligen Tieres zu ermöglichen. Die Aufarbeitung der Tiere erfolgte in den Räumen der Core Facility Zentrale Versuchstierhaltung der Universitätsmedizin Rostock.

Die Tiere mussten dafür zunächst narkotisiert werden. Es wurden 20 µl/10 g Körpergewicht eines Ketamin-Xylazin-Gemisches eingesetzt, wobei dieses 10 % Ketamin und 2 % Xylazin enthielt. Durch Punktion des retrobulbären Venenplexus wurde Blut in einem EDTA-Röhrchen gesammelt, welches später zur Serumgewinnung genutzt wurde. Die Tiere wurden durch eine zervikale Dislokation getötet, der Bauchraum wurde rasiert und ein Medianschnitt wurde durchgeführt.

Anschließend wurde zunächst das Pankreas präpariert und entnommen, da es durch die pankreatischen Enzyme bereits nach kurzer Zeit zum Selbstverdau neigt. Das Organ wurde dreigeteilt, wobei jedes Drittel sowohl einen Teil des Pankreaskopfes als auch des Pankreasschwanzes enthielt. Ein Drittel wurde in flüssigem Stickstoff schockgefrostet (natives Gewebe) und bis zur Verwendung bei -150 °C gelagert. Ein weiteres Drittel wurde in Tissue-Tek<sup>®</sup> eingebettet (Kryogewebe), ebenfalls schockgefrostet und bis zur Verwendung bei -80 °C aufbewahrt. Das letzte Drittel wurde in Formalin fixiert (Paraffingewebe), bevor es weiter verarbeitet wurde.

Je eine Niere und ein Teil der Leber wurden ebenfalls in Tissue-Tek<sup>®</sup> eingebettet (Kryogewebe), schockgefrostet und bei -80 °C gelagert. Der jeweils andere Teil der Organe wurde bis zur weiteren Verarbeitung in Formalin fixiert (Paraffingewebe).

Die Milz wurde in 2 ml Zellkulturmedium gegeben und für die weiteren Arbeiten (Gewinnung von Milzzellen) in das Forschungslabor der Gastroenterologie überführt.

Die *in vitro* Generierung von DZs aus KM wurde nach standardisierten Protokollen durchgeführt [82]. Zur KM-Gewinnung wurden zusätzlich zu den bereits beschriebenen Schritten die beiden unteren Extremitäten von Fell befreit und inklusive des Hüftkopfes präpariert. Die Achillessehne und die Patellasehne wurden durchtrennt, der Fuß wurde abgenommen und Unter- und Oberschenkel voneinander gelöst. Femur und Tibia wurden komplett von Muskel- und Bindegewebe befreit und die Markhöhlen beider Knochen mit *phosphate buffered saline* (PBS) gespült. Das PBS mit dem darin enthaltenen KM wurde bis

zu den weiteren Arbeitsschritten auf Eis gelagert. Von den Spendertieren für die Generierung von DZs wurden keine Milzen entnommen.

Die weiterführenden Arbeiten (Gewinnung, Isolation und Kultivierung der Zellen) sind in Abschnitt 3.5 (Zellkulturmethoden) geschildert.

#### 3.4.2.1 Serumgewinnung

Das Blut wurde während der Organentnahme in den EDTA-Röhrchen belassen. Anschließend wurden die Röhrchen für 5 min bei 10 000 x g und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Das Serum wurde abpipettiert und in einem neuen 1,5 ml Reaktionsgefäß erneut zentrifugiert, bevor es bei -80 °C bis zur Verwendung eingefroren wurde.

#### 3.4.2.2 Verarbeitung der in Formalin gelagerten Organe

Die Organe, die für das Einbetten in Paraffin vorgesehen waren, wurden für 24-72 h in Formalin fixiert. Anschließend erfolgte eine automatisierte 24-stündige Entwässerung der Organe in einer Histokinette, bevor diese in Paraffin eingebettet und bis zur weiteren Verwendung bei RT gelagert wurden.

### 3.5 Zellkulturmethoden

Die für die Zellgewinnung benötigten Organe (Milz und Knochenmark) wurden, wie in Abschnitt 3.4.2 (Entnahme der Organe der Spendertiere) beschrieben, entnommen. Alle weiteren Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank mit laminarem Luftstrom durchgeführt. Alle Zentrifugationsschritte wurden, soweit nicht anders ausgewiesen, für 10 min bei 300 x g und 4 °C durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C, wasserdampfgesättigter Atmosphäre und 5 % CO<sub>2</sub>-Zufuhr.

#### 3.5.1 Zellkulturmedien

Die genaue Zusammensetzung der Zellkulturmedien und eine Auflistung der Herkunft der verwendeten Substanzen sind im Anhang ab Seite VIII beschrieben. Sowohl für die Arbeiten mit Milzzellen als auch für die Arbeiten mit DZs wurde ein Zellkulturmedium verwendet, was folgendermaßen zusammengesetzt war: RMPI-1640 mit 10 % fetales Kälberserum (FKS), 1 % Penicillin/Streptomycin und 50 µM β-Mercaptoethanol. Für die Verwendung des Mediums für DZs wurde zusätzlich unmittelbar vor Benutzung 20 ng/ml GM-CSF hinzugefügt, was die Differenzierung der KM-Zellen zu DZs fördert.

### 3.5.2 Gewinnung und Kultivierung von Milzzellen für den Transfer von $CD3^+$ , $CD3^+CD4^+$ , $CD3^+CD8^+$ und $CD4^+CD44^{high}$ T-Zellen

Für den Transfer von  $CD3^+$ ,  $CD3^+CD4^+$ ,  $CD3^+CD8^+$  und  $CD4^+CD44^{high}$  T-Zellen wurden aus der in Zellkulturmedium gelagerten Milz zunächst Milzzellen gewonnen. Dafür wurde die Milz in ein steriles Umfeld überführt. Für die Gewinnung der Zellen wurde das Organ durch ein Zellsieb mit 70  $\mu m$  großen Poren gepresst. Die Zellsuspension wurde für 10 min bei RT in Zellkulturmedium inkubiert, dem 50  $\mu g/ml$  DNase I zugefügt waren. Es folgte ein Zentrifugationsschritt. Im Anschluss wurde das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert und es wurden 4 ml eiskaltes 0,25 M  $NH_4Cl$  hinzugegeben, um die vorhandenen Erythrozyten zu lysieren. Nach 3-minütiger Inkubation auf Eis wurde der Vorgang durch die Zugabe von 10 ml Zellkulturmedium abgestoppt und die Zellsuspension erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Bei Vorhandensein von Geweberückständen wurde die Zellsuspension bei Bedarf durch ein Zellsieb mit 40  $\mu m$  großen Poren gegeben.

Im Anschluss wurde die Zellzahl mit einer Neubauerzählkammer bestimmt. Dazu wurde eine kleine Menge der Zellsuspension 1:100 mit PBS und dann nochmal 1:2 mit Trypanblau verdünnt. Es wurden vier große Quadrate ausgezählt und die Zellzahl anhand folgender Formel berechnet:  $Zellzahl/ml = (Anzahl\ gezählter\ Zellen \times Verdünnungsfaktor \times 10\ 000)/4$ . Der Verdünnungsfaktor beträgt im vorliegenden Fall 1:200.

Die Milzzellen wurden anschließend in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in 75  $cm^2$  großen Zellkulturflaschen ausgesät. Dabei wurden maximal 30 ml/Zellkulturflasche verwendet. Zusätzlich wurden der Zellkultur 25  $\mu l/ml$  Phytohämagglutinin (PHA) hinzugefügt. PHA ist ein unspezifisches Mitogen, das die T-Zellen zur Proliferation anregen soll. Diese Stimulation erfolgte in Anlehnung an die Arbeiten von Kanno *et al.* [74].

Die Milzzellen wurden für 3 Tage kultiviert, bevor die Isolation der verschiedenen T-Lymphozyten-Subpopulationen erfolgte.

### 3.5.3 Isolation von $CD3^+$ , $CD3^+CD4^+$ , $CD3^+CD8^+$ und $CD4^+CD44^{high}$ T-Zellen

Die Isolation der verschiedenen T-Lymphozyten-Subpopulationen erfolgte nach 3-tägiger Zellkultur der Milzzellen mithilfe von folgenden Isolationskits:  $CD3^+$  T-Zellen: Pan T Cell Isolation Kit II, mouse;  $CD4^+$  T-Zellen:  $CD4^+$  T Cell Isolation Kit, mouse;  $CD8^+$  T-Zellen:  $CD8^+a$  T Cell Isolation Kit, mouse;  $CD4^+CD44^{high}$  T-Zellen: Mouse Memory T Cell  $CD4^+/CD62L^-/CD44^{high}$  Column Kit. Alle Kits wurden nach den Herstellerangaben eingesetzt

und resultierten durch Negativselektion der gewünschten Zellen in unmarkierten Zellpopulationen.

Die Isolationen von  $CD3^+$ ,  $CD3^+CD4^+$  und  $CD3^+CD8^+$  T-Zellen erfolgten dabei durch die MACS<sup>®</sup>-Separationsmethode von Miltenyi Biotec: die in 75 cm<sup>2</sup> großen Zellkulturflaschen inkubierten Milzzellen wurden abgeerntet, zentrifugiert, das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert und mit Trypanblau angefärbte Zellen mittels Neubauerzählkammer in einer 1:4-Verdünnung gezählt. Alle folgenden Mengenangaben beziehen sich auf die maximale Zellzahl von  $1 \times 10^7$  Zellen. Bei höheren Zellzahlen wurden die Mengen entsprechend angepasst. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet in 40 µl MACS<sup>®</sup>-Puffer resuspendiert und 10 µl eines Biotin-AK-Gemisches hinzugegeben. Die Zusammensetzung des AK-Gemisches unterschied sich zwischen den Kits und folgte den jeweiligen Herstellerangaben. Nach 5-minütiger Inkubation bei 4 °C wurden weitere 30 µl MACS<sup>®</sup>-Puffer und 20 µl anti-Biotin-MicroBeads hinzugegeben und für 10 min bei 4 °C inkubiert. Die Separation der Zellen erfolgte über LS-Säulen. Diese wurden in einem QuadroMACS<sup>®</sup>-Separator mit 3 ml MACS<sup>®</sup>-Puffer gewaschen, bevor die Zellsuspension auf die Säule gegeben wurde. Der Durchfluss enthielt die angereicherte, gewünschte Population und wurde in einem sterilen Röhrchen aufgefangen. Die Säulen wurden mit 3 ml MACS<sup>®</sup>-Puffer gespült und der Durchfluss ebenfalls aufgefangen. Bevor die Zellen für den Transfer vorbereitet wurden, erfolgte eine Überprüfung der Reinheit der Zellpopulationen durch durchflusszytometrische Messungen (s. Abschnitt 3.5.6 (Beurteilung der Isolationsqualität mittels Durchflusszytometrie)).

$CD4^+CD44^{high}$  T-Zellen wurden mithilfe einer Säulenseparation von R&D Systems aus Milzzellen isoliert: bis zu  $2 \times 10^8$  Zellen wurden in 2 ml sterilem Säulen-Puffer aufgenommen und mit 1 ml eines Gemisches im Kit enthaltener monoklonaler AKs vermengt. Nach 15 min Inkubation bei RT wurden die Zellen zwei Mal mit 10 ml Säulen-Puffer gewaschen und anschließend in 2 ml Säulen-Puffer aufgenommen. Nachdem die Säule ebenfalls mit 10 ml Säulen-Puffer gewaschen worden war, wurde die Zellsuspension auf die Säule gegeben und für 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 12 ml Säulen-Puffer von der Säule eluiert. Der Durchfluss wurde in einem sterilen Röhrchen gesammelt. Bevor die Zellen für den Transfer vorbereitet wurden, erfolgte eine Überprüfung der Reinheit der Zellpopulationen durch durchflusszytometrische Messungen (s. Abschnitt 3.5.6 (Beurteilung der Isolationsqualität mittels Durchflusszytometrie)).

### 3.5.4 Gewinnung, Isolation und Expansion von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen

Im Gegensatz zu den bereits beschriebenen Isolationen, erfolgte die MACS<sup>®</sup>-basierte Isolation von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen am selben Tag wie die Milzentnahme und Milzzellgewinnung. Die Milzzellen wurden nach dem Zählen nicht für die Zellkultur ausgesät, sondern in 40 µl (pro 1 x 10<sup>7</sup> Zellen) MACS<sup>®</sup>-Puffer und 10 µl Biotin-CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T-Zellen-AK-Gemisch resuspendiert und für 10 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 30 µl MACS<sup>®</sup>-Puffer, 20 µl anti-Biotin-MicroBeads und 10 µl eines anti-Maus CD25-PE-AK. Nach 15-minütiger Inkubation bei 4 °C wurde das Volumen gegebenenfalls auf 500 µl aufgefüllt und die Zellsuspension auf eine LD-Säule gegeben. Die Säule war in einem QuadroMACS<sup>®</sup>-Separator eingespannt und wurde vor Gebrauch mit 2 ml MACS<sup>®</sup>-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden zwei Mal mit 1 ml MACS<sup>®</sup>-Puffer eluiert und der Durchfluss, der die gewünschten Zellen enthielt, aufgefangen. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert und das Pellet in 90 µl MACS<sup>®</sup>-Puffer und 10 µl anti-PE-Beads aufgenommen. Nach 15-minütiger Inkubation bei 4 °C wurden bis zu 1 x 10<sup>8</sup> Zellen in einem Volumen von 500 µl MACS<sup>®</sup>-Puffer suspendiert. Für die zweite Separation wurden MS-Säulen verwendet, welche in einen MiniMACS<sup>®</sup>-Separator eingespannt und mit 500 µl MACS<sup>®</sup>-Puffer gewaschen wurden. Nach Zugabe der Zellsuspension folgte ein erneutes zweimaliges Waschen mit 500 µl MACS<sup>®</sup>-Puffer. Die Säulen wurden im Anschluss aus dem Separator genommen und auf einem sterilen Röhrchen platziert. Die Säulen wurden schnellstmöglich mit 1 ml MACS<sup>®</sup>-Puffer befüllt und unmittelbar danach mit einem Stempel gespült. Der Durchfluss wurde aufgefangen und der Prozess mit einer weiteren gewaschenen Säule wiederholt. Der erneut gewonnene Durchfluss wurde ebenfalls aufgefangen und für die Kultivierung und Expansion der Zellen genutzt.

#### 3.5.4.1 Expansion der regulatorischen T-Zellen

Die Kultivierung und gleichzeitige Expansion der T<sub>regs</sub> erfolgte mit dem Treg Expansion Kit, mouse von Miltenyi Biotec und wurde nach Herstellerangaben mit kleinen Änderungen durchgeführt. Dem Zellkulturmedium (s. auch Abschnitt 3.5.1) wurde für die Expansion vor Gebrauch 2000 U/ml IL-2 hinzugefügt. Die Expansion fand Bead-basiert mit CD3/CD28 MACSiBeads<sup>™</sup> statt. Die MACSiBeads<sup>™</sup> mussten dafür in einer Konzentration von 6 x 10<sup>6</sup> Beads/ml vorliegen. Die Vorbereitung der Beads erfolgte nach Herstellerangaben.

Der aufgefangene Durchfluss mit den isolierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen wurde zentrifugiert und das Pellet in einer Konzentration von 2 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml resuspendiert. Davon wurden 200 µl Zellsuspension in die Vertiefungen einer 24-well-Mikrotiterplatte gegeben und mit 200 µl

Beads/Vertiefung gemischt (**Tag 0**). Am nächsten Tag (**Tag 1**) wurden in jede Vertiefung 400 µl Zellkulturmedium mit IL-2 gegeben, sodass das Gesamtvolumen pro Vertiefung nun 800 µl betrug. An den **Tagen 3 und 5** wurde jeweils die Hälfte des Volumens (400 µl) durch frisches IL-2-haltiges Medium ersetzt. An **Tag 7** erfolgte die Erneuerung der Beads. Dazu wurden die Zellen zunächst vollständig abgeerntet und mit Zellkulturmedium gewaschen. Die Zellzahl wurde bestimmt und bis zu  $2 \times 10^7$  Zellen wurden in 1 ml MACS<sup>®</sup>-Puffer gelöst. Die Zellen wurden dann in entsprechenden Reaktionsgefäßen im MACSiMAG<sup>TM</sup>-Separator für 4 min inkubiert. Der Überstand enthielt die gewünschten Zellen und keine MACSiBeads<sup>TM</sup> und wurde in einem frischen Röhrchen gesammelt. Die im ursprünglichen Reaktionsgefäß zurückgebliebenen MACSiBeads<sup>TM</sup> wurden in 1 ml MACS<sup>®</sup>-Puffer resuspendiert und erneut für 4 min im MACSiMAG<sup>TM</sup>-Separator inkubiert. Der neue Überstand wurde dem alten Überstand hinzugefügt und aus der gesammelten Zellsuspension wurde die Zellzahl bestimmt. Die Expansion wurde dann für weitere 7 Tage (insgesamt also **14 Tage**) auf identische Weise wiederholt. Nach Ablauf der Expansionszeit erfolgte eine Überprüfung der Reinheit der Zellpopulation durch durchflusszytometrische Messungen (s. Abschnitt 3.5.6 (Beurteilung der Isolationsqualität mittels Durchflusszytometrie)), bevor die Zellen für den Transfer vorbereitet wurden.

### 3.5.5 Gewinnung von KM-Zellen und *in vitro* Generierung von dendritischen Zellen

Eine Isolierung von DZs aus Pankreasgewebe ist zwar theoretisch möglich, aber die Ausbeute ist sehr gering, selbst wenn das gesamte Organ genutzt wird. Zusätzlich war es in den vorliegenden Arbeiten nicht möglich, das gesamte Pankreas für die Zellisolierung zur Verfügung zu stellen, da dieses für die histologische Beurteilung nötig war. Für den Transfer von DZs mussten die DZs daher *in vitro* aus KM generiert werden. Die Gewinnung von KM ist in Abschnitt 3.4.2 beschrieben. Das in PBS enthaltene KM wurde im Anschluss durch ein Zellsieb mit 150 µm großen Poren filtriert und zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet in 5 ml Zellkulturmedium resuspendiert. 100 µl dieser Zellsuspension wurden abpipettiert und 5 min bei RT mit 100 µl eines Erythrozytenlyse-Puffers inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wurden 800 µl PBS hinzugegeben und aus der erythrozytenfreien Zellsuspension die Zellzahl bestimmt. Die KM-Zellen wurden mit einer Zelldichte von  $3 \times 10^5$  Zellen/ml in 6-well-Mikrotiterplatten eingesät, wobei das Volumen pro Vertiefung 3 ml betrug (**Tag 0**). An **Tag 3** wurden vorsichtig 1 ml pro Vertiefung abpipettiert und 2 ml frisches Zellkulturmedium hinzugegeben. An den **Tagen 6 und 8** erfolgte ein Mediumwechsel von 2 ml Zellkulturmedium pro Vertiefung: 2 ml pro Vertiefung wurden abpipettiert,

zentrifugiert, das Pellet in 2 ml frischem Zellkulturmedium resuspendiert und zurück in die Vertiefung gegeben, um den Zellverlust möglichst gering zu halten. An **Tag 9** wurden alle Zellen abgeerntet, wobei jede Vertiefung gründlich gespült und der Inhalt der Vertiefungen pro Spendertier gepoolt wurde. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in angemessenem Volumen (z.B. 1 ml Volumen pro geernteter Vertiefung) resuspendiert. Die Zellzahl wurde bestimmt und die Zellen in einer Konzentration von  $3 \times 10^5$  Zellen/ml (und 4 ml/Vertiefung) für die Stimulation neu ausgesät. Stimuliert wurden die Zellen mit 1 µg/ml LPS für 24 h. An **Tag 10** wurden die Zellen erneut abgeerntet, zentrifugiert und mit PBS gewaschen. Das Pellet wurde im Anschluss in einer adäquaten Menge PBS aufgenommen und die Zellzahl wurde bestimmt. Die Qualität der generierten DZs wurde durch durchflusszytometrische Messungen bestimmt (s. Abschnitt 3.5.6 (Beurteilung der Isolationsqualität mittels Durchflusszytometrie)), bevor die Zellen für den Transfer vorbereitet wurden.

### 3.5.6 Beurteilung der Isolationsqualität mittels Durchflusszytometrie

Die Reinheit aller isolierten Zellpopulationen wurde mittels Durchflusszytometrie überprüft. Dazu wurden bis zu  $1 \times 10^6$  Zellen der entsprechenden Zellpopulation in 45 µl PBS pro Färbeansatz aufgenommen. Die Auswahl der AKs war von der jeweiligen Zellpopulation abhängig und ist in Tabelle 3 aufgelistet. Wenn es aufgrund der vorhandenen Fluoreszenzfarbstoffe möglich war, wurden Zwei- oder Dreifachfärbungen durchgeführt. Zunächst wurde bei allen Ansätzen durch die Zugabe von 10 µg/ml *FcR-blocking reagent* eine Blockade des Fc-Rezeptors durchgeführt, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Nach 10-minütiger Inkubation bei 4 °C wurden für die Färbungen 3 µg/ml der entsprechenden AKs (außer anti-FoxP3-AK) zu der Zellsuspension gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 4 °C und lichtgeschützt für 20 min. Anschließend wurden die gefärbten Zellen mit 1 ml PBS gewaschen und für die Messung in 200 µl PBS aufgenommen.

**Tabelle 3. Färbeansätze der verschiedenen Zellpopulationen für durchflusszytometrische Messungen.**

Zellpopulation	1. AK	2. AK	3. AK	4. AK	5. AK	6. AK
Milzzellen	anti-CD3	anti-CD4	anti-CD8	anti-CD19	-	-
CD3 <sup>+</sup> T-Zellen	anti-CD3	anti-CD4	anti-CD8	anti-CD19	-	-
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen	anti-CD3	anti-CD4	anti-CD8	anti-CD19	-	-
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen	anti-CD3	anti-CD4	anti-CD8	anti-CD19	-	-
CD4 <sup>+</sup> CD44 <sup>high</sup> T-Zellen	anti-CD4	anti-CD44	anti-CD62L	-	-	-
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> T <sub>regs</sub>	anti-CD4	anti-CD25	anti-FoxP3	-	-	-
DZs	anti-CD11c	anti-CD40	anti-CD80	anti-CD83	anti-CD86	anti-MHC-II



Die Messungen wurden an einem FACSCalibur™ oder FACSVerse™ durchgeführt. Es wurden jeweils 20 000 *events* der gewünschten Zellpopulation gemessen. Die Auswertung der Daten erfolgte dann mit der CellQuestPro- oder der FACSuite-Software (Version 10.2.6 bzw. Version 1.0.6).

#### 3.5.6.1 FoxP3-Färbung

FoxP3 ist ein intrazellulär exprimiertes Protein. Um das Protein anfärben zu können, war eine Permeabilisierung der Zellen nötig. Für die Permeabilisierung und Färbung von FoxP3 wurden die Reagenzien von Miltenyi Biotech verwendet und nach Herstellerangaben eingesetzt.

Die zu färbenden Zellen wurden dazu in 1 ml frisch angesetzter *fixation/permeabilization*-Lösung aufgenommen und für 30 min bei 4 °C in Dunkelheit inkubiert. Danach folgten Waschschritte mit 1 ml PBS (Zentrifugation: 1000 x g, 5 min, 4 °C) und 1 ml kaltem *permeabilization*-Puffer. Das Pellet wurde in 45 µl kaltem *permeabilization*-Puffer gelöst und für 5 min bei 4 °C und lichtgeschützt mit dem *FcR-blocking reagent* inkubiert. Anschließend erfolgte die Färbung mit 5 µl anti-FoxP3-AK für 30 min bei 4 °C und lichtgeschützt. Die Zellen wurden erneut mit 1 ml kaltem *permeabilization*-Puffer gewaschen und dann in 200 µl PBS für die Messung aufgenommen.

Die Messung der FoxP3-Färbung wurde an einem FACSVerse™ durchgeführt und mit der FACSuite-Software (Version 1.0.6) ausgewertet. Es wurden 20 000 *events* der gewünschten Zellpopulation gemessen.

### 3.6 Adoptiver Zelltransfer

Die Vorbereitung der isolierten bzw. generierten Zellpopulationen für den adoptiven Transfer erfolgte unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank. Die Zellen wurden in PBS so verdünnt, dass in 200 µl Volumen die gewünschte Zellmenge vorhanden war. Für den Transfer von CD3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen und den dazugehörigen Vergleichsgruppen (Gruppen 1-3) sowie von DZs wurden 5 x 10<sup>6</sup> Zellen benötigt (Tabelle 2). Da die Ausbeute bei der Isolation von CD4<sup>+</sup>CD44<sup>high</sup> T-Zellen geringer war, wurden bei dieser Gruppe und der dazugehörigen Vergleichsgruppe 7 nur 2 x 10<sup>6</sup> Zellen transferiert. Bei den CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> wurde aus ähnlichen Gründen eine Menge von 2,5 x 10<sup>6</sup> Zellen gewählt.

Da die Zellausbeute aus einem Spendertier bzw. aus dessen Milz unter Umständen nicht ausreichend war, um die benötigte Menge an Zellen für den Transfer zu generieren, wurden

bei Bedarf die Zellen mehrerer Spendertiere gepoolt. Details zu diesem Verfahren sind in Abschnitt 3.7.3 (Der AIP-Score des Pankreas) beschrieben.

Der Transfer der verschiedenen Zellpopulationen erfolgte in den Räumen der Core Facility Zentrale Versuchstierhaltung der Universitätsmedizin Rostock. Die Zellen wurden in einem Volumen von 200 µl über die Schwanzvene in die narkotisierten MRL/MpJ-Empfängertiere gespritzt. Dazu wurden Kanülen mit einem Durchmesser von 0,45 mm und Einmalspritzen verwendet. Das Aufwachen der Tiere wurde kontrolliert und die weitere Haltung und Versorgung der Tiere fand in den Räumen der Core Facility statt.

### **3.6.1 Versuchsende und Organentnahme**

Nach Ende der 6-wöchigen Versuchszeit wurden die Empfängertiere aufgearbeitet. Die Narkose und Präparation der Organe wurden, wie in Abschnitt 3.4.2 (Entnahme der Organe der Spendertiere) bereits erläutert, durchgeführt. Pankreata, Lebern und Nieren wurden, wie zuvor beschrieben, verarbeitet. Zusätzlich wurde bei den Empfängertieren die Milz halbiert und ebenfalls in Tissue-Tek® (Kryogewebe) oder in Paraffin eingebettet.

## **3.7 Histologische Methoden**

Die Hauptzielgröße der in dieser Arbeit beschriebenen Versuche war das Auftreten AIP-typischer Veränderungen im Pankreasgewebe. Die histologischen Färbungen dienten der Beurteilung der Krankheitsausprägung sowohl bei den Spender- als auch bei den Empfängertieren. Vorrangig war dazu die Beurteilung der Pankreata nötig, aber auch Lebern und Nieren wurden begutachtet, da das Auftreten von entzündlichen Herden in diesen Organen als Begleiterscheinung der AIP bekannt ist. Für die histologischen Untersuchungen wurden die Kryo- und Paraffinorgane geschnitten und gefärbt. Die detaillierten Abläufe sind im Folgenden beschrieben.

### **3.7.1 H&E-Färbung**

H&E-Färbungen können an in Paraffin eingebetteten Organschnitten durchgeführt werden und bieten durch das gleichzeitige Anfärben von Zellkernen und Gewebe die Möglichkeit, ein Organ umfassend zu beurteilen. Diese Übersichtsfärbungen wurden von den Organen der Spendertiere (Pankreas, Leber, Niere) und der Empfängertiere (zusätzlich Milz) angefertigt.

Dazu wurden zunächst 4 µm dicke Schnitte der Organe erzeugt, diese auf einen Objektträger transferiert und über Nacht bei 65 °C getrocknet. Die Färbung wurde dann nach dem in Tabelle 4 dargestellten Schema durchgeführt. Alle Inkubationsschritte fanden unter einem Abzug statt. Im Anschluss an den letzten Schritt, wurden die gefärbten Präparate mit Pertex® eingebettet. Die Auswertung erfolgte an einem Durchlichtmikroskop.

**Tabelle 4. Ablauf der H&E-Färbung.**

<b>Lösung</b>	<b>Inkubationsdauer</b>	<b>Vorgang</b>
Xylol	10 min	Entparaffinieren
Xylol	10 min	Entparaffinieren
Ethanol 96 %, vergällt	5 min	Wässern
Ethanol 96 %, vergällt	3 min	Wässern
Ethanol 70 %, vergällt	2 min	Wässern
destilliertes Wasser	2 min	Wässern
Hämatoxylin	1 min	Färben der Kerne
fließendes Leitungswasser	1 min	Bläuen
destilliertes Wasser	kurz	Spülen
Eosin + 2 % Essigsäure	1 min	Färben des Gewebes
destilliertes Wasser	kurz	Spülen
Ethanol 70 %, vergällt	kurz	Entwässern
Ethanol 96 %, vergällt	kurz	Entwässern
Ethanol 96 %, vergällt	kurz	Entwässern
Xylol	30 sek	Entwässern
Xylol	30 sek	Entwässern

### 3.7.1.1 Der H&E-Score des Pankreas

Die H&E-gefärbten Pankreata sowohl der Spender- als auch der Empfängertiere wurden unter Zuhilfenahme eines semiquantitativen Scoring-Systems (H&E-Score) verblindet bewertet. Die Skala reichte von 0 (gesundes Organ) bis 4 (hochgradig krankes Organ) und wurde im Detail durch folgende Kriterien bestimmt [75]:

- **Score 0:** gesundes Pankreasgewebe mit intakten Azinus- und Inselstrukturen, keine Infiltration von mononukleären Zellen;
- **Score 1:** Ansammlung und/oder Infiltration von mononukleären Zellen im Bereich des Interstitiums, besonders gang- und gefäßnah, keine Zerstörung des Parenchyms;
- **Score 2:** beginnende multifokale Zerstörung des Parenchyms durch Infiltration von mononukleären Zellen;
- **Score 3:** diffuse Zerstörung des Parenchyms durch großflächige Infiltration von mononukleären Zellen, Bereiche mit intaktem Parenchym noch vorhanden;
- **Score 4:** massive Infiltration von mononukleären Zellen, dadurch fast komplette Zerstörung des Parenchyms, besonders des Azinusgewebes oder Ersetzen durch Fettgewebe, Inselstrukturen bleiben weitestgehend verschont.

Grundsätzlich wurden Tiere mit einem Score von 0 oder 1 als „gesund“ bezeichnet, während Tiere mit einem Score ab 2 als „krank“ eingestuft wurden.

### 3.7.1.2 Beurteilung H&E-gefärbter Lebern und Nieren

Es ist bekannt, dass Immunzellherde bei einer AIP auch in anderen Organen betroffener MRL/MpJ-Mäuse auftreten [57]. Im Gegensatz zu den Pankreata wurden die H&E-gefärbten Lebern und Nieren der Empfängertiere aller Gruppen qualitativ beurteilt und nur zwischen dem Vorhandensein oder Nichtvorhandensein von Infiltraten unterschieden.

### 3.7.2 Immunhistochemie

Immunhistochemische Färbemethoden dienen der spezifischen Anfärbung bestimmter Zellstrukturen durch AK-basierte Färbungen. Durch die farbliche Markierung von Oberflächenmolekülen können so z.B. verschiedene Zelltypen unterschieden werden. Diese Methode wurden in der vorliegenden Arbeit vor allem genutzt, um den sogenannten CD3-Score der Spender- und Empfängertiere zu ermitteln (s. Abschnitt 3.7.2.1) und die Zusammensetzung der Immunzellinfiltrate in den Pankreata zu untersuchen.

Für die immunhistochemischen Färbungen wurde das Avidin-Biotin-Peroxidase (ABC)-System von Vector Laboratories verwendet. Zunächst wurden dafür von den in Tissue-Tek® eingebetteten Pankreata 6 µm dicke Schnitte angefertigt und auf einen Objektträger transferiert. Die Präparate wurden anschließend für 30 sek in eiskaltem Methanol fixiert und drei Mal mit PBS gewaschen. Die einzelnen Schnitte wurden mit einem Fettstift umrandet und für 15 min mit einer Avidin D-Lösung blockiert. Nach den drei darauf folgenden Waschschritten mit PBS erfolgte eine 15-minütige Inkubation mit einer Biotin-Lösung. Anschließend wurden die Präparate für 1 h mit 2 % *goat*-Serum (in PBS) geblockt, bevor der Primär-AK für 1 h auf die Schnitte gegeben wurde. Zur Überprüfung der Infiltratzusammensetzung wurden folgende Primär-AK verwendet (detaillierte Auflistung der verwendeten AKs im Anhang ab Seite VIII): anti-Maus CD3-AK (5 µg/ml), anti-Maus CD4-AK (5 µg/ml), anti-Maus CD8-AK (1 µg/ml), anti-Maus CD44-AK (2,5 µg/ml). Nach der Inkubation folgten erneut drei Waschschrritte mit PBS, bevor der Sekundär-AK für 30 min auf die Schnitte gegeben wurde. Alle verwendeten Primär-AKs stammten aus der Ratte, sodass in allen Fällen ein anti-Ratten-AK als Sekundär-AK verwendet werden konnte. Dieser wurde für die Detektion von CD3 und CD44 in einer Konzentration von 0,75 µg/ml eingesetzt und für die Detektion von CD4 und CD8 in einer Konzentration von 1,5 µg/ml. Anschließend wurden die Schnitte drei Mal mit PBS gewaschen und für weitere 30 min mit dem ABC-Reagenz inkubiert. Drei weiteren Waschschrritten mit PBS folgte die Inkubation mit dem Peroxidase-Substrat. Das Substrat wurde für 1-10 min auf den Schnitten belassen, je nachdem wann eine makroskopisch sichtbare Rotfärbung der Schnitte zu sehen war. Die Präparate

wurden dann für 5 min in Leitungswasser gewaschen und für 4 min mit 1:5-verdünntem Hämalaun gefärbt. In lauwarmem Leitungswasser wurden die Schnitte für 5 min gebläut und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (je 2-mal absoluter Ethanol und Xylol). Im Anschluss wurden die gefärbten Präparate in Pertex<sup>®</sup> eingebettet und unter einem Lichtmikroskop begutachtet.

#### 3.7.2.1 Der CD3-Score des Pankreas

Die in der Immunhistochemie gefärbten Pankreata der Spender- und Empfängertiere wurden für die Krankheitsbeurteilung der Tiere hinsichtlich des Auftretens von CD3<sup>+</sup> T-Zellen im Gewebe bewertet. Dazu wurde in Anlehnung an den HE-Score ein ebenfalls 4-gradiges Scoring-System benutzt, was folgenden Kriterien folgte:

- **Score 0:** keine Infiltrate von CD3<sup>+</sup> T-Zellen;
- **Score 1:** minimale Infiltration von CD3<sup>+</sup> T-Zellen im periduktalen Gewebe;
- **Score 2:** moderate Infiltration von CD3<sup>+</sup> T-Zellen im periduktalen Gewebe, beginnende Infiltration auch von Parenchym;
- **Score 3:** ausgedehnte und multifokale Infiltration von CD3<sup>+</sup> T-Zellen im periduktalen und parenchymalen Gewebe;
- **Score 4:** massive Infiltration von CD3<sup>+</sup> T-Zellen im gesamten Gewebe, Inselstrukturen bleiben weitestgehend verschont.

#### 3.7.3 Der AIP-Score des Pankreas

Um das Auftreten AIP-typischer Veränderungen in der Pankreashistologie von MRL/MpJ-Mäusen objektiv bewerten zu können, wurde der sogenannte AIP-Score entwickelt. Die Beurteilung des Schweregrades einer murinen AIP erfolgte an gefärbtem Pankreasgewebe. Um ein möglichst umfassendes Bild des Organs zu bekommen, wurden möglichst viele Einzelschnitte eines Pankreas beurteilt, mindestens jedoch 8.

Der AIP-Score jedes Organs wurde aus den Einzelbewertungen des H&E-Scores und des CD3-Scores zusammengesetzt. Dazu wurden zuerst die beiden Einzelscores verblindet an jeweils mindestens 4 Schnitten aufgestellt. Dann wurden die Scores zu dem neuen AIP-Score zusammengefasst. Erhielt ein Organ bei beiden Scores verschiedene Einteilungen, wurde der höhere Score gewählt, da eine abweichende Ausprägung an verschiedenen Stellen des Organs durchaus wahrscheinlich ist. Das Verfahren wurde von zwei unabhängigen Gutachtern durchgeführt. Bei starken Abweichungen der Scores zwischen den beiden Gutachtern, wurden die Schnitte gemeinsam erneut beurteilt. Der AIP-Score wurde auf diese Weise sowohl für die Spender- als auch für die Empfängertiere aufgestellt.

Da die Zellausbeute teilweise nicht ausreichte, um den Transfer mit der gewünschten Zellzahl durchzuführen, wurden die Zellen verschiedener Spendertiere bei einigen Transfers gepoolt. Dabei wurde ein besonderes Augenmerk auf die Verteilung des AIP-Scores gelegt. Es wurden soweit möglich nur Zellen von Spendertieren kombiniert, die denselben Score erhalten hatten. War dies nicht möglich, wurden auch Zellen von Spendertieren kombiniert, bei denen sich der AIP-Score unterschied. In diesem Fall wurde der tatsächliche AIP-Score unter Berücksichtigung der ungefähren Menge der eingesetzten Zellen als Mittelwert errechnet.

### **3.8 Statistische Auswertung**

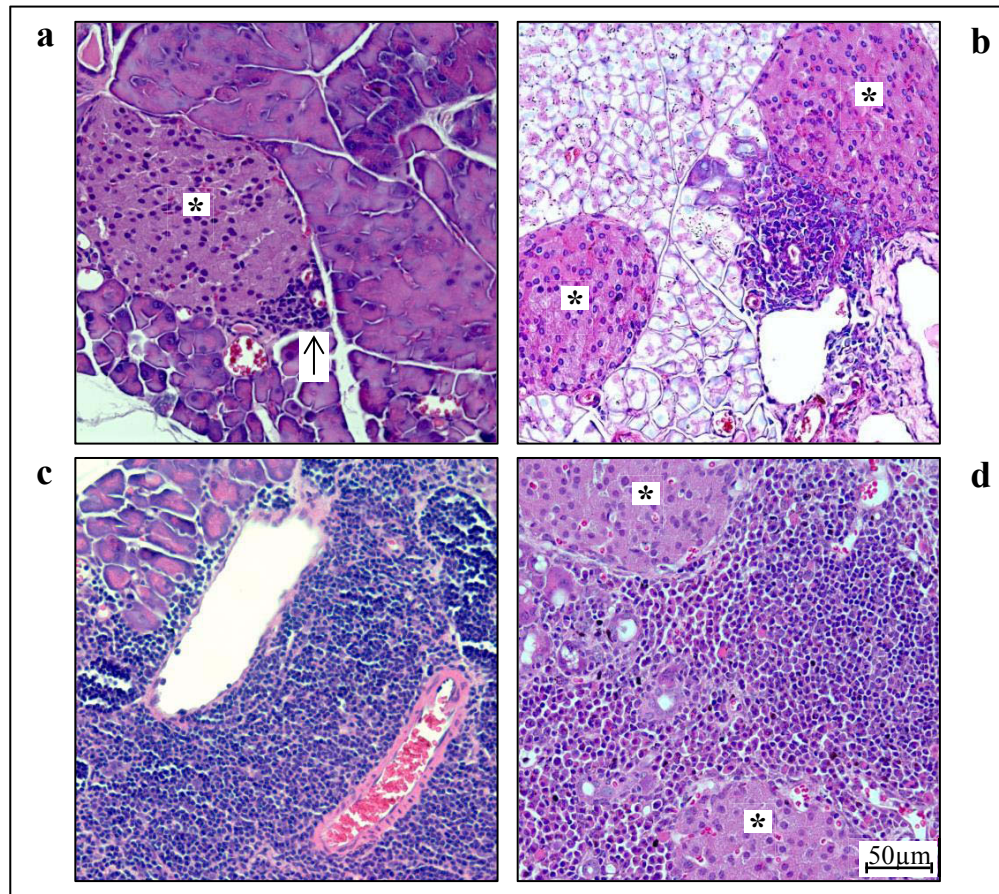
Die statistische Auswertung aller Daten erfolgte mit der SPSS Statistics-Software (Version 22.0) von IBM. Nach einer Überprüfung der Normalverteilung mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests (bestanden, wenn  $< 0,05$ ), wurde der Mann-Whitney-*U*-Test angewandt, um die Gruppen jeweils mit der Kontrollgruppe zu vergleichen. Lediglich die Gruppen 10 und 11 wurden nur miteinander verglichen. Statistische Signifikanz wurde erreicht, wenn der *p*-Wert auch nach der Bonferroni-Korrektur noch  $< 0,05$  war. Alle Angaben (Alter und AIP-Scores von Spender- und Empfängertieren aller Gruppen, sowie Prozentsatz betroffener Lebern und Nieren) sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Ausgewachsene MRL/MpJ-Mäuse entwickeln spontan eine AIP

Für die adoptiven Zelltransferversuche wurden weibliche Mäuse des MRL/MpJ-Stammes als Spendertiere für verschiedene T-Lymphozyten-Subpopulationen und DZs genutzt. Es sollte überprüft werden, ob Zellen aus Tieren, die an einer AIP leiden, die Erkrankung auf gesunde Tiere übertragen können. Als Spendertiere dienten demzufolge Mäuse mit einem fortgeschrittenen Alter, da die Häufigkeit der Ausprägung einer murinen AIP mit steigendem Alter erhöht ist [74, 75]. Lediglich die Spendertiere der Vergleichsgruppe 2 waren jünger (s. auch Tabelle 2) und dienten als „gesunde Spendergruppe“. In beiden Fällen mussten die Ausprägung bzw. das Fehlen von Anzeichen einer AIP nachgewiesen werden. Dazu wurde der AIP-Score genutzt, der mittels einer 4-stufigen Skala den Schweregrad der Erkrankung im Pankreas beurteilt. Der AIP-Score setzt sich aus dem H&E-Score und dem CD3-Score zusammen (s. Abschnitt 3.7.3 (Der AIP-Score des Pankreas)). Ein AIP-Score von 0 bedeutet, dass das Pankreasgewebe vollkommen intakt ist und keinerlei krankheitsspezifische Veränderungen aufweist. Eine Zunahme von infiltrierenden Immunzellen hat einen steigenden AIP-Score zur Folge. In Abbildung 3 sind Aufnahmen H&E-gefärbter Pankreata mit den H&E-Scores 1-4 dargestellt, welche hier beispielhaft für die Zusammensetzung des AIP-Scores gezeigt werden. Abbildung 3 a entspricht einem H&E-Score von 1. Es ist nur ein kleiner Immunzellherd (verdeutlicht durch ↑) nahe einer Gefäßstruktur zu sehen. Das restliche Azinusgewebe ist nicht betroffen. Bei einem H&E-Score von 2 (Abbildung 3 b) ist ebenfalls ein Herd aus Immunzellen sichtbar (bläuliche Anfärbung der dicht gepackten Zellkerne), der bereits größer ist und teilweise beginnt, das Azinusgewebe zu infiltrieren. Das Areal des Immunzellinfiltrats bei Abbildung 3 c (H&E-Score 3) ist deutlich großflächiger und hat bereits große Teile des Azinusgewebes zerstört. Dennoch sind noch funktionstüchtige Bereiche zu sehen (links oben). Bei dem dargestellten H&E-Score von 4 (Abbildung 3 d) hingegen ist kein intaktes Azinusgewebe mehr zu erkennen und der gesamte Schnitt besteht aus dicht gepackten Immunzellen. Bei allen 4 Scores sind die Inselzellen (\*) von den Immunzellinfiltraten nicht betroffen.

Der AIP-Score der Spendertiere wurde ermittelt, bevor die isolierten bzw. generierten Zellen in die Empfängertiere gespritzt wurden. Dieses Verfahren war notwendig, um sicher zu stellen, dass nur Zellen „kranker“ Tiere (mit Ausnahme der „gesunden“ Spendertiere der Vergleichsgruppe 2) transferiert wurden. Stammten die isolierten bzw. generierten Zellen aus Mäusen mit einem AIP-Score von 0 oder 1, so wurden diese Zellen nicht für einen adoptiven



**Abbildung 3. Beispielhafte Aufnahmen H&E-gefärbter Pankreata von Spendertieren mit H&E-Scores von 1-4.** Die Pankreata der Spendertiere wurden für 24-72 h in Formalin fixiert, anschließend in Paraffin eingebettet, geschnitten und H&E gefärbt. Die Beurteilung der Krankheitsschwere wurde anhand des H&E-Scores getroffen. Dargestellt sind beispielhafte Aufnahmen von den H&E-Scores 1 (a), 2 (b), 3 (c) und 4 (d). ↑ verdeutlicht einen kleinen Immunzellherd (a) und \* die Inselzellen (a, b, d). Die hier dargestellten H&E-Scores stehen beispielhaft auch für den AIP-Score.

Transfer verwendet. In Tabelle 2 sind die AIP-Scores der Spendertiere aller Gruppen aufgeführt. Der durchschnittliche AIP-Score der Spendertiere (mit Ausnahme der „gesunden“ Spendertiere aus Vergleichsgruppe 2) beträgt  $2,9 \pm 0,1$ . Damit zeigten die Spendertiere dieser Gruppen stark ausgeprägte Immunzellinfiltrate und eine Zerstörung des Parenchyms. Der durchschnittliche AIP-Scores der Vergleichsgruppe 2 beträgt  $0,2 \pm 0,2$ . Die Häufigkeit der Ausprägung einer AIP war in dieser Gruppe also deutlich geringer und die Spendertiere konnten als „gesund“ bezeichnet werden.

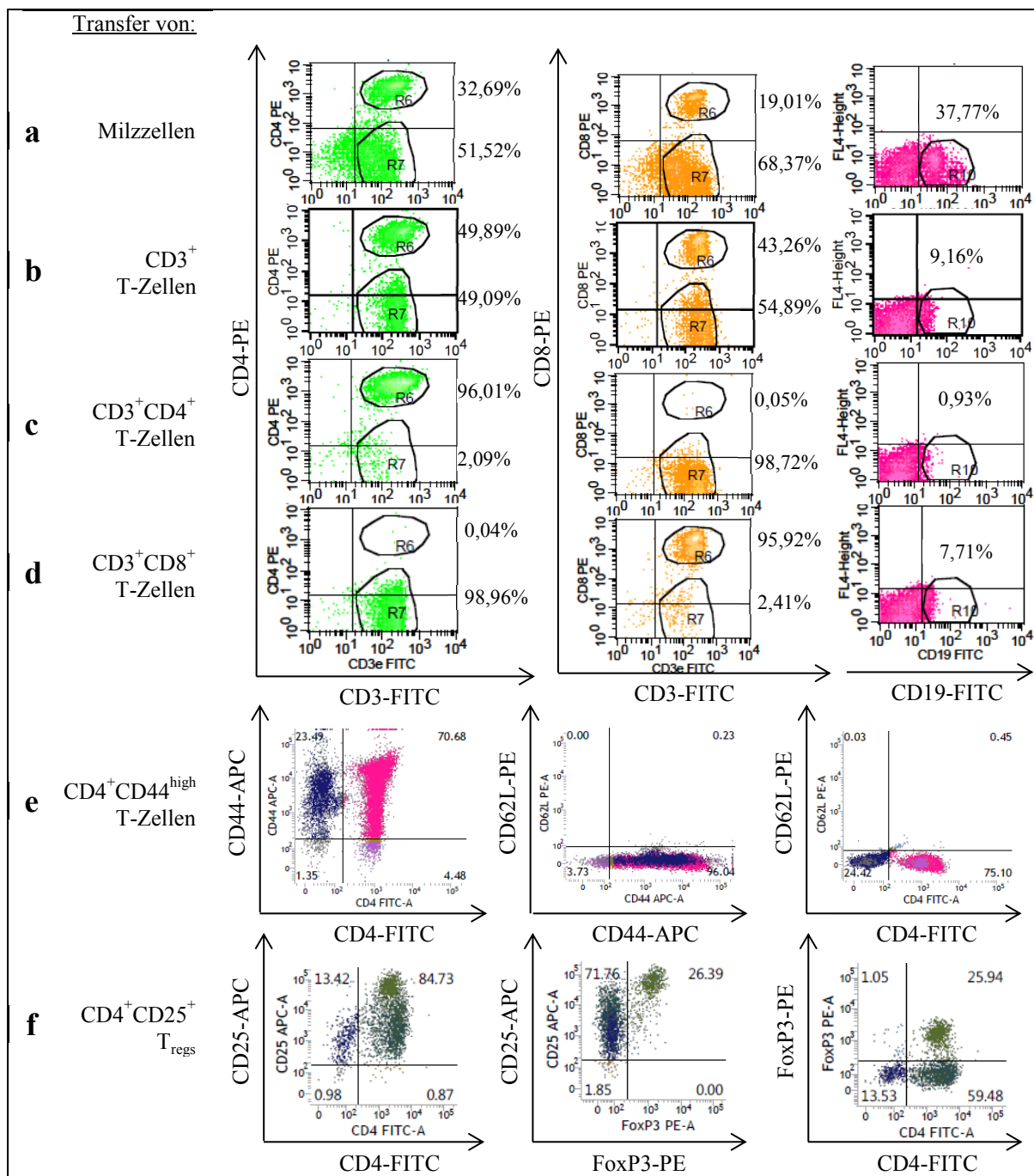
Die ermittelten AIP-Scores für die Spendertiere konnten zeigen, dass ausgewachsene, weibliche MRL/MpJ-Mäuse spontan und ohne Manipulation eine AIP entwickeln. Die Zellen der Spendertiere konnten wie geplant für den Transfer verschiedener T-Lymphozyten-Subpopulationen und DZs genutzt werden.



## **4.2 Die Isolation der Zellen führte zu reinen Zellpopulationen**

Vor dem eigentlichen Transfer der verschiedenen T-Zell-Subpopulationen und DZs wurde die Reinheit der isolierten bzw. generierten Zellen mittels durchflusszytometrischer Messungen überprüft. Beispielhafte Punktwolken der Messungen für alle T-Zellpopulationen sind in Abbildung 4 dargestellt. Die Messungen mit den entsprechenden AKs sind für die verschiedenen Zellpopulationen reihenweise dargestellt (Abbildung 4 a-f). Bei den Milzzellen, den  $CD3^+$ ,  $CD3^+CD4^+$  und  $CD3^+CD8^+$  T-Zellen wurden jeweils die Oberflächenmoleküle CD3, CD4, CD8 (alles Marker für verschiedene T-Lymphozyten-Populationen) und CD19 (Marker für B-Lymphozyten) mit den entsprechenden Fluorochrom-markierten AKs angefärbt. Die Milzzellen (Abbildung 4 a) bestehen zum Großteil aus  $CD3^+$ -positiven Zellen (ca. 85 %) und enthalten sowohl rund 30 %  $CD4^+$ - als auch rund 20 %  $CD8^+$ -positive Zellen. In der Milzzellpopulation sind ca. 40 %  $CD19^+$ -positive Zellen vorhanden, was durch die fehlende Isolation einer bestimmten T-Zellart erwartet wurde. Die isolierte  $CD3^+$  T-Zellpopulation (Abbildung 4 b) besteht zu fast 100 % aus  $CD3^+$ -positiven Zellen und zu je rund 50 % aus  $CD4^+$ - bzw.  $CD8^+$ -positiven Zellen;  $CD19^+$ -exprimierende B-Zellen sind im Prinzip nicht vorhanden. Damit konnte gezeigt werden, dass die Negativselektion zu einer hochgradig reinen Zellpopulation führte. Auch die Messung von  $CD4^+$  bzw.  $CD8^+$  bei den isolierten  $CD3^+CD4^+$  bzw.  $CD3^+CD8^+$  T-Zellen (Abbildung 4 c bzw. d) bestätigen das Gelingen der Negativselektion: es sind jeweils > 95 % reine  $CD3^+CD4^+$ - bzw.  $CD3^+CD8^+$ -doppelt-positive Zellpopulationen zu sehen und keine  $CD19^+$ -positiven B-Zellen (< 10 %).

Für die Isolation von  $CD4^+CD44^{high}$  T-Zellen wurde ein Säulenisolationskit verwendet, das nach Herstellerangaben zur Gewinnung von  $CD4^+/CD62L^-/CD44^{high}$  T-Zellen genutzt werden kann. Entsprechend wurden bei dieser Zellpopulation (Abbildung 4 e) die Oberflächenmoleküle CD4, CD44 und CD62L (Markerkombination für Gedächtnis-T-Zellen) angefärbt. In den beiden rechten Punktwolken ist zu sehen, dass keine  $CD62L^+$ -positiven Zellen vorhanden sind (< 1 %). Die Färbung von CD4 und CD44 zeigt rund 70 %  $CD4^+CD44^{high}$ -doppelt-positive Zellen und rund 25 %  $CD44^{high}$ -einfach-positive Zellen. Die Isolation von  $CD4^+CD44^{high}$  T-Zellen führte also ebenfalls zu einer fast reinen Zellpopulation.

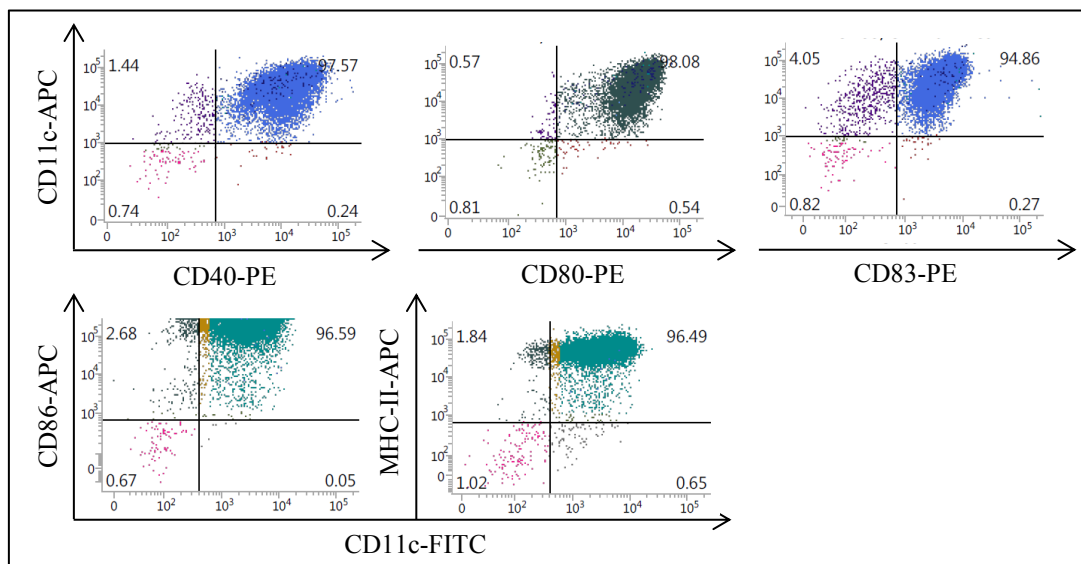


**Abbildung 4. Reinheit der isolierten T-Zellpopulationen.** Milzzellen wurden aus Milzen von MRL/MpJ-Mäusen gewonnen und entweder zunächst für 3 Tage kultiviert oder direkt zur Isolation der entsprechenden T-Lymphozyten-Subpopulationen genutzt. Die Oberflächenmoleküle CD3, CD4, CD8, CD19, CD44, CD62L und CD25 wurden mit den entsprechenden Fluorochrom-markierten AKs in einer 20-minütigen Inkubation angefärbt. Das intrazelluläre FoxP3 wurde nach einer 30-minütigen Permeabilisierung der Zellen ebenfalls AK-basiert angefärbt. Alle Zellen wurden in PBS aufgenommen und an einem FACSCalibur™ bzw. FACSVerse™ gemessen (20000 *events* pro Messung). Die Auswertung erfolgte mit der CellQuestPro- oder FACSuite-Software (Version 10.2.6 bzw. 1.0.6). Bei a-d sind die Expressionen der Oberflächenmoleküle CD3, CD4, CD8 und CD19 zu sehen. Die Expressionen von CD4, CD44 und CD62L sind in e dargestellt und die Expressionen von CD4, CD25 und FoxP3 in f. Zusammenfassend ist zu sehen, dass alle Zell-Populationen zu einem hohen Grad rein waren. Sie konnten wie geplant für die Transferversuche eingesetzt werden.

Für die Überprüfung der Reinheit der expandierten  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen (Abbildung 4 f) wurden die Oberflächenmoleküle CD4 und CD25 (Markerkombination für aktivierte T-Zellen und  $T_{regs}$ ), sowie das intrazelluläre FoxP3 (Marker für  $T_{regs}$ ) angefärbt. In der linken Punktewolke ist zu sehen, dass rund 85 % der Zellen CD4CD25-doppelt-positiv sind und rund 15 % CD25-einfach-positiv. Es sind in etwa 25 % CD4FoxP3- bzw. CD25FoxP3-doppelt-positive Zellen vorhanden und jeweils ein entsprechend großer Anteil an FoxP3-negativen Zellen.

Die Reinheit aller zu transferierenden T-Zell-Subpopulationen war somit nachweislich gegeben und die Zellen konnten wie geplant für den Transfer verwendet werden.

#### 4.2.1 Reinheit der *in vitro* generierten DZs



**Abbildung 5. Reinheit der *in vitro* generierten DZs aus KM.** KM wurde aus den Unter- und Oberschenkeln von Spender-MRL/MpJ-Mäusen gewonnen. Die KM-Zellen wurden anschließend für 10 Tage mit GM-CSF kultiviert, wobei ein regelmäßiger Wechsel des Mediums stattfand. Für die Überprüfung der Reinheit der generierten DZs wurden die Oberflächenmoleküle CD11c, CD40, CD80, CD83, CD86 und MHC-II mit Fluorochrom-markierten AKs angefärbt und im FACSVerse<sup>TM</sup> gemessen (20000 *events*). Die Auswertung erfolgte mit der FACSuite-Software (Version 1.0.6).

Die Reinheit der mit LPS stimulierten DZs wurde nach Ablauf des 10-tägigen Protokolls ebenfalls überprüft. Beispielhafte Punktewolken sind in Abbildung 5 zu sehen. In Anlehnung an eigene Vorarbeiten wurde die Expression der Oberflächenmoleküle CD11c, CD40, CD80, CD83, CD86 und MHC-II mit entsprechenden Fluorochrom-markierten AKs überprüft [79]. CD11c ist ein Marker für murine DZs und wurde deshalb in Doppelfärbungen verwendet, um die Anteile der jeweils positiven Zellen an den DZs zu überprüfen. Zunächst ist in allen Punktewolken in Abbildung 5 zu erkennen, dass nahezu alle Zellen ( $\geq 95\%$ ) CD11c-positiv

sind und daher davon ausgegangen werden kann, dass eine reine Population dendritischer Zellen generiert wurde. Die CD11c-positiven DZs sind jeweils zu fast 100 % CD40-, CD80-, CD86- und MHC-II-positiv. Lediglich bei dem Oberflächenmolekül CD83 (Reifungsmarker für DZs) sind rund 5 % CD83-negative Zellen innerhalb der DZ-Population zu sehen.

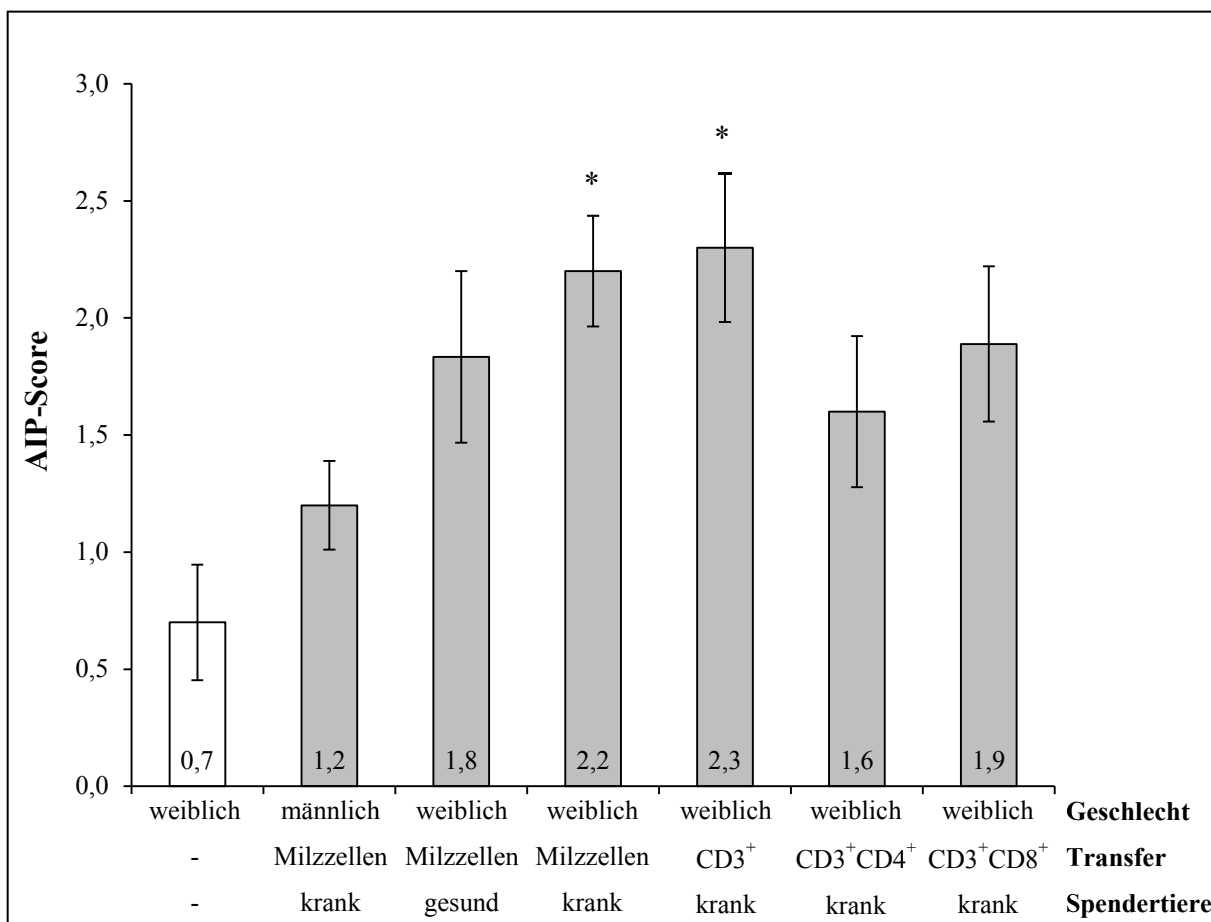
Insgesamt konnte auch hier gezeigt werden, dass die durchgeführte *in vitro* Generierung zu einer reinen DZ-Population geführt hat. Die Zellen konnten ebenfalls wie geplant für den Transfer verwendet werden.

### **4.3 Milzzellen, CD3<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup>CD44<sup>high</sup> T-Zellen übertragen eine murine AIP**

In der vorliegenden Arbeit wurde überprüft, ob eine murine AIP von erkrankten Mäusen des MRL/MpJ-Stammes auf gesunde übertragen werden kann. Dazu wurden zunächst Milzzellen aus Spendertieren mit einem AIP-Score von mindestens 2 gewonnen („kranke“ Spendertiere) und diese entweder direkt für die Isolation von regulatorischen T-Zellen genutzt oder für 3 Tage kultiviert, bevor anschließend CD3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> oder CD4<sup>+</sup>CD44<sup>high</sup> T-Zellen isoliert wurden. Die Reinheit der isolierten Zellpopulationen wurde überprüft, bevor die Zellen anschließend in junge, gesunde Empfängertiere oder in entsprechende Vergleichsgruppen transferiert wurden. Eine Kontrollgruppe ohne Zelltransfer wurde ebenfalls mitgeführt. 6 Wochen nach der Zellinjektion erfolgte eine Begutachtung der Pankreata der Empfängertiere. Die Auswertung wurde analog zu den Bewertungen bei den Spendertieren durchgeführt: die Pankreata der Empfängertiere wurden für die histologischen Färbungen vorbereitet und sowohl H&E- als auch CD3-gefärbt. Beide Färbemethoden wurden für jedes einzelne Tier an jeweils mindestens 4 Schnitten ausgewertet (H&E- und CD3-Score) und beide Beurteilungen anschließend zu dem AIP-Score zusammengefasst.

#### **4.3.1 Transfer von Milzzellen, CD3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen**

In einer ersten Versuchsrunde wurden neben einer Kontrollgruppe (kein Zelltransfer), sowohl Milzzellen als auch CD3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen transferiert. Die Auswertung der AIP-Scores ist in Abbildung 6 zu sehen (s. auch Tabelle 2). Aufgeführt sind die durchschnittlichen AIP-Scores der Gruppen 1-6, sowie der Kontrollgruppe (weißer Balken). Die Kontrollgruppe erhielt keinen Zelltransfer und der durchschnittliche AIP-Score der Empfängertiere aus dieser Gruppe beträgt  $0,7 \pm 0,2$ . Die Häufigkeit von AIP-Anzeichen war in dieser Gruppe also gering und im Durchschnitt können die Mäuse der Kontrollgruppe als „gesund“ angesehen werden.



**Abbildung 6. AIP-Scores der Empfängertiere nach dem Transfer von Milzzellen, CD3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen.** Milzzellen bzw. CD3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden aus Spendertieren gewonnen und in Empfängertiere injiziert. Nach 6 Wochen erfolgte die Aufarbeitung der Pankreata der Empfängertiere und eine Beurteilung der Organe mittels H&E- und CD3-Score. Aus beiden Scores wurde der AIP-Score ermittelt, welcher hier für die Vergleichsgruppen 1-3 und die Versuchsgruppen 4-6 (s. dazu auch Tabelle 2) sowie für die Kontrollgruppe (weißer Balken) dargestellt ist. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte  $\pm$  SEM der Gruppen; \*  $p < 0,05$  nach Bonferroni-Korrektur (Mann-Whitney-U-Test).

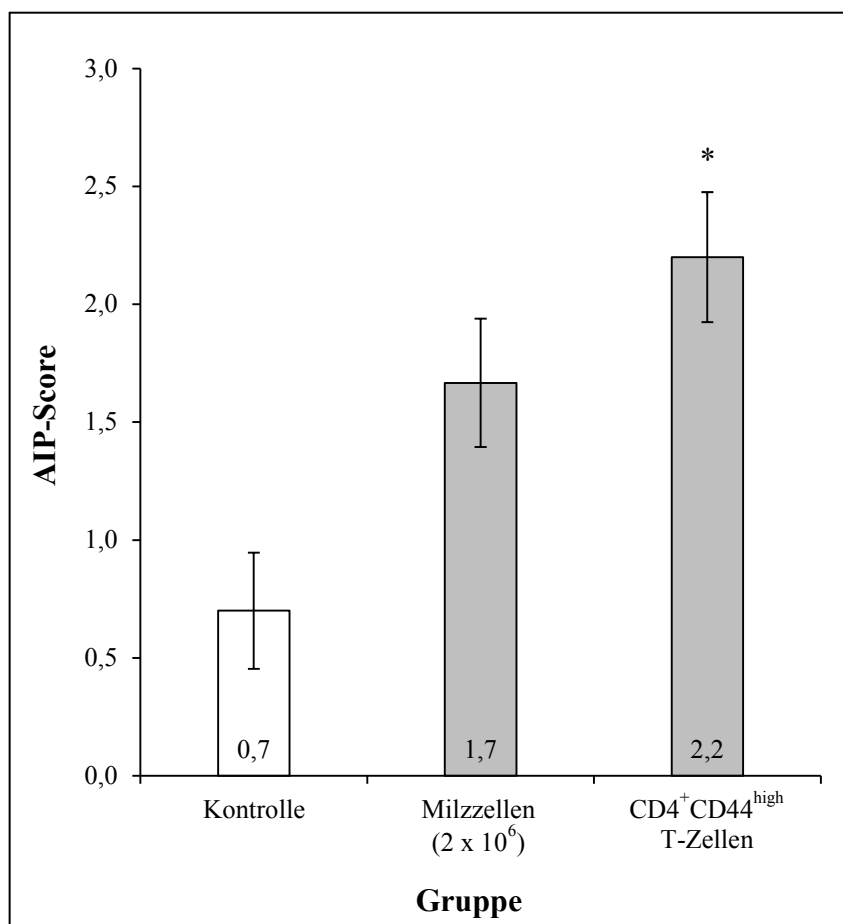
Bei den Vergleichsgruppen 1 und 2 (Transfer von Milzzellen in männliche Empfängertiere bzw. aus gesunden Spendertieren) führte der Transfer von Milzzellen zu durchschnittlichen AIP-Scores von  $1,2 \pm 0,2$  und  $1,8 \pm 0,4$ . In beiden Fällen sind die AIP-Scores unter 2 geblieben. Das Vorhandensein von autoimmunen Herden war damit so gering, dass die Tiere im Durchschnitt als „gesund“ angesehen werden können. Die Erhöhung der AIP-Scores gegenüber der Kontrollgruppe ist statistisch nicht signifikant. Im Gegensatz dazu führte der Transfer von Milzzellen aus „kranken“ in „gesunde“ MRL/MpJ-Mäuse (Vergleichsgruppe 3) zu einem durchschnittlichen AIP-Score von  $2,2 \pm 0,2$ . Die Erhöhung des AIP-Scores im Vergleich zur Kontrollgruppe ist statistisch signifikant ( $p = 0,018$ ). Ebenso verhält es sich bei der Versuchsgruppe 4, bei der CD3<sup>+</sup> T-Zellen transferiert wurden: der durchschnittliche AIP-

Score dieser Empfängergruppe beträgt  $2,3 \pm 0,3$ , was statistisch höher ist als der Wert der Kontrollgruppe ( $p = 0,036$ ). Bei beiden Gruppen liegt der AIP-Score über 2 und die Tiere dieser Empfängergruppen können als „krank“ eingestuft werden. Der Transfer von  $CD3^+CD4^+$  bzw.  $CD3^+CD8^+$  T-Zellen führte zu AIP-Scores von  $1,6 \pm 0,3$  bzw.  $1,9 \pm 0,3$ . Beide Durchschnittscores sind gegenüber der Kontrollgruppe statistisch nicht signifikant erhöht.

#### 4.3.2 Transfer von Milzzellen und $CD4^+CD44^{high}$ T-Zellen

In einer nächsten Versuchsrunde wurde das prinzipielle Versuchsdesign für den Transfer von  $CD4^+CD44^{high}$  T-Zellen beibehalten. Da die Zellausbeute bei der Isolation geringer war, wurde lediglich die Zellzahl der transferierten Zellen reduziert (s. dazu auch Tabelle 2). Die Anzahl der Milzzellen der entsprechenden Vergleichsgruppe 7 wurde ebenfalls angepasst und auf  $2 \times 10^6$  Zellen pro Transfer verringert. Die Ergebnisse der Auswertung der AIP-Scores nach dem Transfer von einer verringerten Anzahl an Milzzellen und  $CD4^+CD44^{high}$  T-Zellen sind in Abbildung 7 zu sehen. Die dargestellte Kontrollgruppe (weißer Balken) ist identisch mit der Kontrollgruppe in Abbildung 6 (AIP-Score  $0,7 \pm 0,2$ ). Der Transfer von einer geringeren Anzahl an Milzzellen (Vergleichsgruppe 7) führte bei den Empfängertieren zu einem durchschnittlichen AIP-Score von  $1,7 \pm 0,3$ . Im Vergleich zu der Kontrollgruppe ist dieser Wert nicht signifikant erhöht. Empfängertiere, die  $CD4^+CD44^{high}$  T-Zellen (Versuchsgruppe 8) injiziert bekamen, entwickelten AIP-Anzeichen, die im Durchschnitt mit einem AIP-Score von  $2,2 \pm 0,3$  bewertet wurden. Im Vergleich zur Kontrollgruppe ist diese Erhöhung statistisch signifikant ( $p = 0,027$ ). Zusätzlich übersteigt der AIP-Score den Wert von 2 und die Tiere können somit als „krank“ angesehen werden.

Zusammenfassend konnte in den beiden ersten Versuchsrunden gezeigt werden, dass sowohl der Transfer von Milzzellen in einer Anzahl von  $5 \times 10^6$  Zellen als auch von  $CD3^+$  und  $CD4^+CD44^{high}$  T-Zellen bei den Empfängertieren zur Ausprägung von Anzeichen einer AIP führte. Die ermittelten AIP-Scores dieser Gruppen waren gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht.



**Abbildung 7. AIP-Scores der Empfängertiere nach dem Transfer von Milzzellen und CD4<sup>+</sup>CD44<sup>high</sup> T-Zellen.** Milzzellen bzw. CD4<sup>+</sup>CD44<sup>high</sup> T-Zellen wurden aus Spendertieren mit einem AIP-Score  $\geq 2$  gewonnen und in junge Empfängertiere injiziert. Nach 6 Wochen erfolgte die Aufarbeitung der Pankreata der Empfängertiere und eine Beurteilung der Organe mittels H&E- und CD3-Score. Beide Scores wurden zu dem AIP-Score vereint, welcher hier für die Vergleichsgruppe 7, die Versuchsgruppe 8 und die Kontrollgruppe dargestellt ist (s. auch Tabelle 2). Die Kontrollgruppe (weißer Balken) ist identisch mit der Kontrollgruppe aus Abbildung 6. Da die Ausbeute an CD4<sup>+</sup>CD44<sup>high</sup> T-Zellen geringer war als bei den anderen T-Zellen, wurde die Anzahl dieser Zellen und der entsprechenden Vergleichsgruppe für den Transfer auf  $2 \times 10^6$  Zellen reduziert. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte  $\pm$  SEM der Gruppen; \*  $p < 0,05$  nach Bonferroni-Korrektur (Mann-Whitney-U-Test).

#### **4.4 Die Zusammensetzung der autoimmunen Herde verändert sich durch den Transfer verschiedener T-Zell-Subpopulationen nicht**

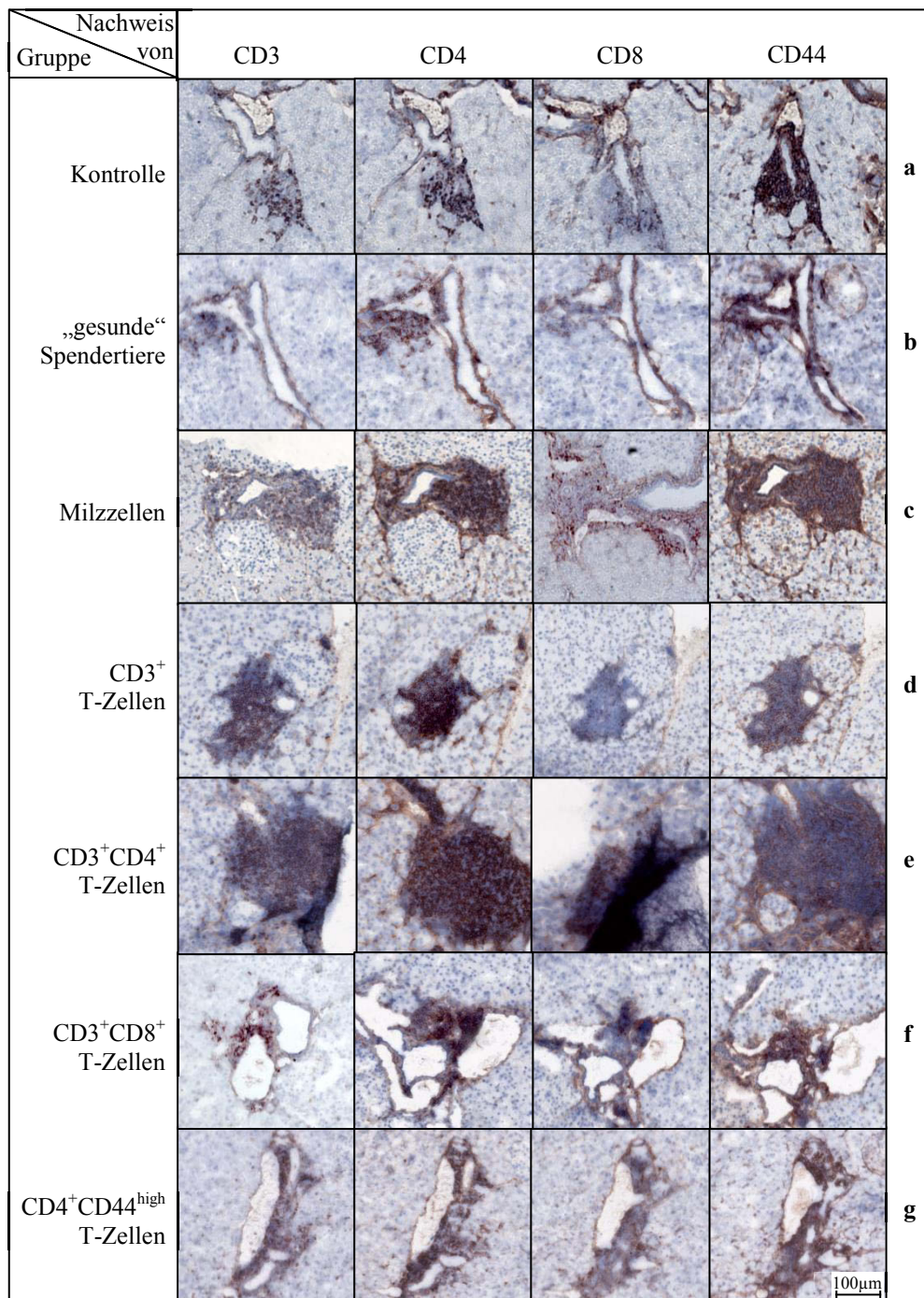
Die H&E-Färbung der Pankreata erlaubt die Beurteilung der Organgewebestruktur im Allgemeinen. So können vor allem Immunzellansammlungen durch dicht gepackte, blau gefärbte Zellkerne erkannt werden (s. dazu auch Abbildung 3). Eine genauere Identifikation der Zelltypen ist allerdings nicht möglich. AK-basierte Färbemethoden in der Immunhistochemie ermöglichen diese Unterscheidung der verschiedenen Zellarten. Durch das

Markieren verschiedener Oberflächenmoleküle können zum Beispiel verschiedene T-Zell-Subpopulationen innerhalb eines Immunzellherdes unterschieden werden. Autoimmune Immunzellherde, die spontan in MRL/MpJ-Mäusen auftreten, bestehen hauptsächlich aus CD3-positiven T-Zellen, wobei innerhalb dieser Population der Anteil an CD4-positiven T-Zellen größer ist als der Anteil an CD8-positiven T-Zellen [58, 74, 75, 77]. Durch immunhistochemische Färbungen mit verschiedenen AKs gegen T-Zell-spezifische Oberflächenmoleküle sollte überprüft werden, ob die Zusammensetzung der Immunzellinfiltrate durch das Auslösen der AIP durch verschiedene T-Lymphozyten-Subpopulationen verändert wird.

Beispielhafte Aufnahmen immunhistochemischer Färbungen der Gruppen 2-6 und 8, sowie der Kontrollgruppe sind in Abbildung 8 dargestellt. Die Pankreata aller Empfängertiere aller Gruppen wurden mit spezifischen AKs gegen CD3, CD4, CD8 und CD44 gefärbt und ausgewertet. Das Vorhandensein der entsprechenden Zellen äußert sich durch eine bräunliche Färbung. Durch das Anfertigen von seriellen Schnitten ist es möglich, die ungefähre Lokalisation der verschiedenen Zellarten miteinander zu vergleichen, obwohl keine Doppelfärbungen angefertigt wurden. Die Zusammensetzung der Immunzellherde der Kontrollgruppe (Abbildung 8 a) entspricht der Zusammensetzung spontan entstandener autoimmuner Herde, da keine Zellen zum Auslösen der AIP transferiert wurden. Der Immunzellherd (mittig) besteht aus CD3-positiven T-Zellen, die an der Zelloberfläche die klassische bräunliche Färbung aufweisen. Der Großteil dieser T-Zellen ist CD4-positiv und nur ein geringerer Anteil ist CD8-positiv. Die Färbung von CD44 ergab zusätzlich, dass ein hoher Anteil CD44-positiver Zellen in den entzündlichen Herden vorhanden ist. Die optische stärkere Anfärbung von CD4- und CD44-positiven Zellen gegenüber CD3-positiven Zellen ist auf Unterschiede der verwendeten AKs in der immunhistochemischen Färbung zurückzuführen.

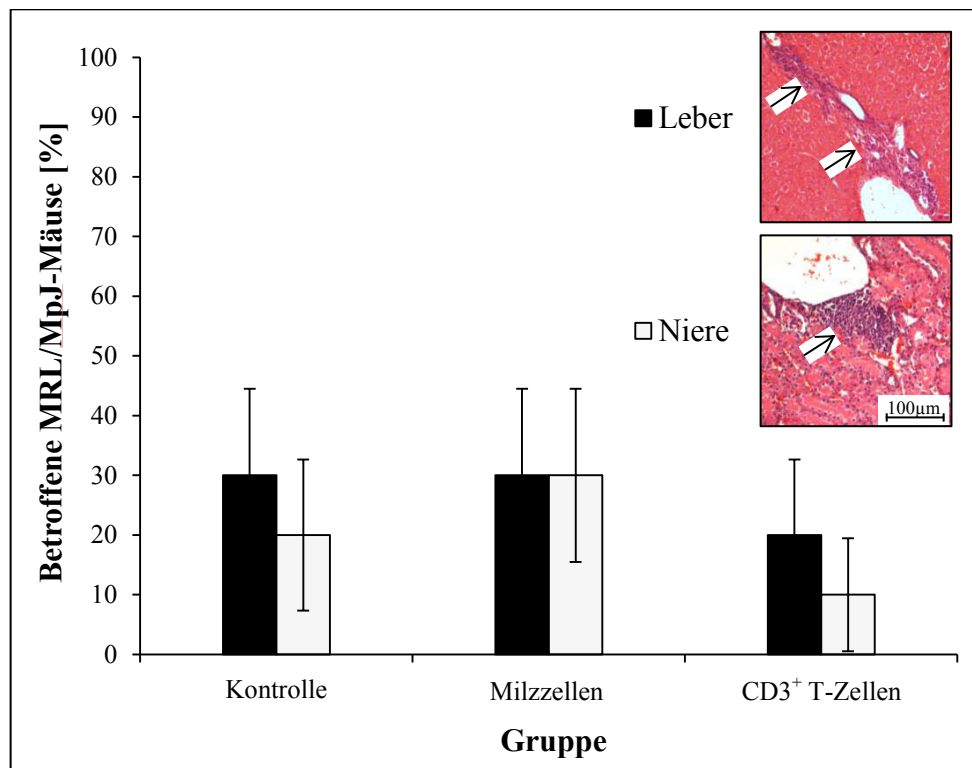
Die eben beschriebene Zusammensetzung der Immunzellinfiltrate wurde durch den Transfer von Milzzellen (Abbildung 8 c), CD3<sup>+</sup> T-Zellen (d), CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen (e), CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen (f) und CD4<sup>+</sup>CD44<sup>high</sup> T-Zellen (g) nicht verändert. Auch der Transfer von Milzzellen aus „gesunden“ Spendertieren (b) hatte keinen Einfluss auf die Komposition der Infiltrate.





**Abbildung 8. Zusammensetzung der Immunzellinfiltrate der Empfängertiere nach dem Transfer verschiedener Zellpopulationen.** 6 Wochen nach dem Zelltransfer verschiedener Zellpopulationen wurden die Pankreata der Empfängertiere in der Immunhistochemie mit AKs gegen CD3, CD4, CD8 und CD44 gefärbt und ausgewertet. Dargestellt sind beispielhafte Aufnahmen der Kontrollgruppe sowie der Gruppen 2-6 und 8. Unterschiede zwischen den Gruppen konnten nicht festgestellt werden. Die optisch stärkere Anfärbung von CD4- und CD44-positiven T-Zellen gegenüber den CD3-positiven T-Zellen ist durch färbespezifische Unterschiede der AKs bedingt.

#### 4.5 Der Transfer von Milzzellen und CD3<sup>+</sup> T-Zellen induziert keine Infiltration von Immunzellen in Lebern und Nieren



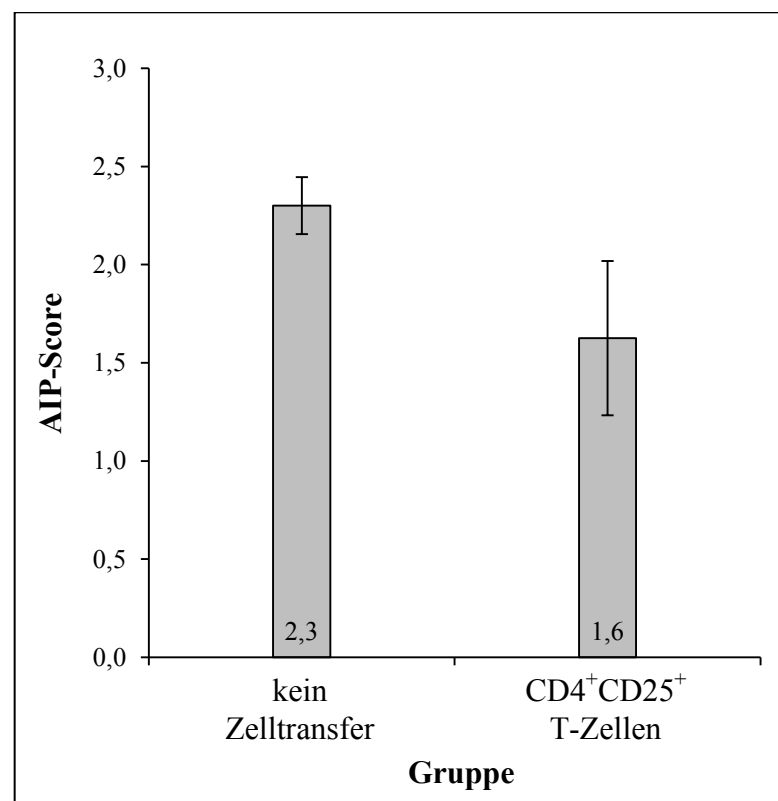
**Abbildung 9. Vorhandensein von Immunzellinfiltraten in Lebern und Nieren der Empfängertiere von Milzzellen und CD3<sup>+</sup> T-Zellen.** Erkrankte MRL/MpJ-Mäuse dienten als Zellspender für Milzzellen oder CD3<sup>+</sup> T-Zellen. Die Zellen wurden in junge Empfängertiere desselben Stammes transferiert und die Lebern und Nieren der Empfängertiere 6 Wochen nach dem Zelltransfer auf das Vorhandensein von Immunzellinfiltraten untersucht. Zusätzlich wurden auch die Organe der Kontrolltiere (kein Zelltransfer) untersucht. Immunzellinfiltrate in Lebern und Nieren sind durch blau angefärbte, dicht gepackte Zellkerne innerhalb des gesunden Gewebes zu erkennen (↑ in histologischen Aufnahmen). Die Unterschiede zu der Kontrollgruppe waren statistisch nicht signifikant (Mann-Whitney-U-Test).

Die murine AIP in MRL/MpJ-Mäusen wird gelegentlich von autoimmunen Herden in Lebern und Nieren begleitet [57]. In der vorliegenden Arbeit wurden daher die Lebern und Nieren der Empfängertiere der Vergleichsgruppe 3 (Transfer von Milzzellen) und der Versuchsgruppe 4 (Transfer von CD3<sup>+</sup> T-Zellen) auf das Vorhandensein von Immunzellinfiltraten in diesen Organen untersucht. In Abbildung 9 ist die Auswertung der Untersuchungen zu sehen. Zum Vergleich wurden auch die Häufigkeiten entzündlicher Infiltrate in Lebern und Nieren der Kontrollgruppe überprüft: bei 30 % der Lebern bzw. 20 % der Nieren der MRL/MpJ-Mäuse der Kontrollgruppe konnten Immunzellinfiltrate beobachtet werden. Die Infiltrate in Lebern und Nieren waren in der H&E-Färbung erneut durch blau angefärbte, dicht gepackte

Zellkerne zu erkennen ( $\uparrow$  in histologischen Abbildungen). Der Transfer von Milzzellen (Vergleichsgruppe 3) oder  $CD3^+$  T-Zellen (Versuchsgruppe 4) veränderte die Häufigkeit der Immunzellherde in den Organen der Empfängertiere nicht. 30 % der Tiere, die Milzzellen injiziert bekamen, zeigten Auffälligkeiten in Lebern und Nieren. Der Transfer von  $CD3^+$  T-Zellen sorgte für Befunde in 20 % der Lebern und 10 % der Nieren. Diese Werte unterschieden sich nicht signifikant von denen der Kontrollgruppe.

Die transferierten Zellen scheinen unter den gegebenen experimentellen Bedingungen keinen Einfluss auf andere anfällige Organe außer das Pankreas zu haben. Das hier angewandte Scoring-System (qualitative Bewertung) ist im Vergleich zu dem AIP-Score (quantitative Bewertung) allerdings weniger gut differenziert.

#### 4.6 Der Transfer von $CD4^+CD25^+$ T<sub>regs</sub> verhindert die Progression der AIP nicht



**Abbildung 10.** AIP-Scores der Empfängertiere nach dem Transfer von  $CD4^+CD25^+$  T<sub>regs</sub>.  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen wurden aus älteren Spendertieren gewonnen und für 2 Wochen expandiert. Der Transfer erfolgte dann in ebenfalls ältere Empfängertiere (Versuchsgruppe 11). Die Empfängertiere einer weiteren Gruppe erhielten keinen Zelltransfer (Vergleichsgruppe 10) und hatten ein ähnliches Alter wie die Empfängertiere aus Versuchsgruppe 11. 6 Wochen nach dem Zelltransfer erfolgte die histologische Beurteilung der Pankreata mittels AIP-Score. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war statistisch nicht signifikant (Mann-Whitney-U-Test).

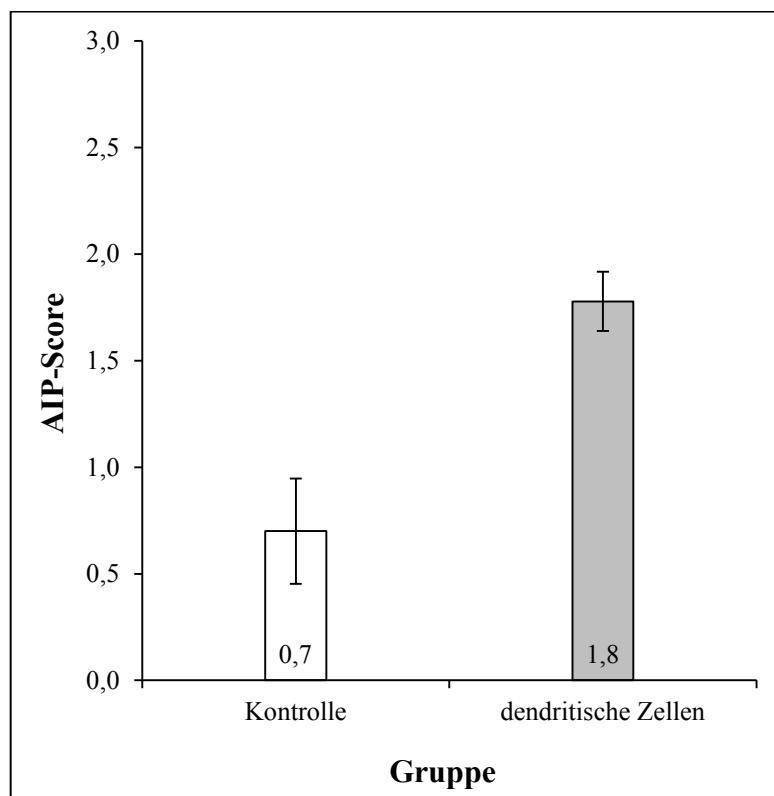
Hinter den bisher beschriebenen Versuchsrunden steht die Hypothese, dass der Transfer von Zellen aus erkrankten MRL/MpJ-Mäusen in gesunde Tiere desselben Stammes eine AIP in den Empfängertieren induzieren kann. Der Transfer von  $CD4^+CD25^+$   $T_{regs}$  hingegen wurde unter der Fragestellung durchgeführt, ob die Progression der Erkrankung in den Tieren durch die Zellen aufgehalten werden kann. Hierzu wurden  $T_{regs}$  aus älteren Spendertieren gewonnen und expandiert und in ebenfalls ältere Empfängertiere injiziert. Da die Expansion der  $T_{regs}$  dennoch zu einer immer noch vergleichsweise geringen Zellausbeute führte, wurde die Anzahl der transferierten Zellen auf  $2,5 \times 10^6$  Zellen reduziert (s. auch Tabelle 2). Das Alter der Empfängertiere ( $30 \pm 0,2$  Wochen) wurde so gewählt, dass die Häufigkeit einer spontan auftretenden AIP bereits hoch ist [74]. Die Ermittlung der AIP-Scores erfolgte wie zuvor beschrieben. Zusätzlich zu der Versuchsgruppe 11 (Transfer von  $T_{regs}$ ) wurde eine weitere Vergleichsgruppe (Vergleichsgruppe 10) mitgeführt, bei der kein Zelltransfer stattfand, aber das Alter der Empfängertiere dem Alter der Versuchsgruppe 11 angepasst war. Die Ergebnisse der Auswertungen sind in Abbildung 10 zu sehen. Die Vergleichsgruppe 10 (kein Zelltransfer) zeigte einen durchschnittlichen AIP-Score von  $2,3 \pm 0,1$ . Der Transfer von  $CD4^+CD25^+$   $T_{regs}$  führte bei den Empfängertieren zur Ausprägung eines durchschnittlichen AIP-Scores von  $1,6 \pm 0,4$ . Dieser Wert liegt zwar tendenziell unter dem der Vergleichsgruppe 10, der Unterschied ist aber statistisch nicht signifikant.

Unter den gegebenen Versuchsbedingungen waren transferierte  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen nicht in der Lage, das Voranschreiten der murinen AIP zu verhindern.

#### **4.7 Der Transfer von DZs führt nicht zu einer Induktion der murinen AIP**

In einer letzten Versuchsrunde wurden DZs erneut von „kranken“ auf „gesunde“ MRL/MpJ-Mäuse transferiert. Als AG-präsentierende Zellen sind DZs generell von Interesse bei Autoimmunität. Zusätzlich weisen eigene genetische Analysen aus der Arbeitsgruppe von Prof. Jaster auf eine potenzielle Rolle dieser Zellart in der murinen AIP hin. Für den Transfer von DZs wurden kDZs *in vitro* aus KM generiert und stimuliert. Die Pankreata der Empfängertiere wurden 6 Wochen nach dem Zelltransfer mittels AIP-Score bewertet. Die Auswertung ist in Abbildung 11 zu sehen. Als Vergleich diente wieder die Kontrollgruppe (weißer Balken, identisch mit den Kontrollen in Abbildung 6 und Abbildung 7) mit einem durchschnittlichen AIP-Score von  $0,7 \pm 0,2$ . Empfängertiere, die DZs transferiert bekamen (Versuchsgruppe 9), entwickelten im Durchschnitt einen AIP-Score von  $1,8 \pm 0,1$ . Die Erhöhung gegenüber der Kontrollgruppe ist nicht signifikant ( $p = 0,090$ ), in der Tendenz aber zu erkennen.

DZs waren unter den gegebenen experimentellen Bedingungen nicht in der Lage, eine AIP in den Empfängertieren auszulösen.



**Abbildung 11. AIP-Scores der Empfängertiere nach dem Transfer von DZs.** DZs wurden *in vitro* aus dem KM erkrankter MRL/MpJ-Mäuse generiert und in gesunde Empfängertiere transferiert. 6 Wochen nach Zelltransfer erfolgte die Auswertung der Pankreata mittels AIP-Score. Die Kontrollgruppe (weißer Balken) ist identisch mit den Kontrollen aus Abbildung 6 und Abbildung 7. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen ist statistisch nicht signifikant ( $p = 0,09$ ; Mann-Whitney-*U*-Tetst).

#### **4.8 Hinweis zur Veröffentlichung der dargestellten Ergebnisse**

Der Großteil der zuvor beschriebenen Ergebnisse wurde in einem Originalartikel veröffentlicht [84]:

**Ehlers L, Rohde S, Ibrahim S, Jaster R.** Adoptive transfer of CD3<sup>+</sup> T cells and CD4<sup>+</sup>CD44<sup>high</sup> memory T cells induces autoimmune pancreatitis in MRL/MpJ mice. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2018; 22: 2404-12.

## 5. Diskussion und Schlussfolgerungen

Die vorliegende Arbeit wurde mit dem Ziel verfasst, die Prozesse der zellulären Immunität in der Pathogenese der AIP näher zu untersuchen. Die AIP ist eine seltene Form der CP. Rund 6 % der CP-Patienten in Asien [19] und ca. 9 % der Patienten mit einer nichtalkoholischen Pankreatitis (AP und CP) in Deutschland [42] leiden tatsächlich an einer AIP. Im klinischen Alltag spielt die Erkrankung vor allem als Differenzialdiagnose zum Pankreaskarzinom eine wichtige Rolle. Je nach Studie werden 5-20 % der Patienten, die mit Verdacht auf ein Pankreaskarzinom operiert werden, nachträglich als AIP-Patienten identifiziert [85]. Der Grund hierfür liegt in den ähnlichen Symptomen beider Patientengruppen und in der schwierigen Diagnostik der AIP. Die HISORT-Kriterien werden für die Diagnose der AIP am häufigsten verwendet [35]. Dabei wird auf eine Kombination aus histologischen Untersuchungen, Bildgebung, Serologie, der Beteiligung anderer Organe und dem Therapieansprechen auf Steroide gesetzt. Die Möglichkeit der Steroidtherapie bei AIP-Patienten verdeutlicht die Wichtigkeit der richtigen Diagnose in Abgrenzung zum Pankreaskarzinom [40]. In dem Serum der Patienten, die an einer AIP Typ 1 leiden, können erhöhte Spiegel des IgG4 gefunden werden [35, 40, 46]. Die AIP Typ 1 wird neuerdings daher auch als pankreatische Manifestation der IgG4-RD angesehen [86]. Im Gegensatz zur AIP Typ 1 sind bei der AIP Typ 2 die IgG4-Serumspiegel nicht erhöht. Diese Form kennzeichnet sich durch GELs, granulozytären Infiltraten zwischen den Epithelzellen der Pankreasgänge, aus [40]. Bei beiden Typen der AIP zeigen sich in histologischen Untersuchungen Immunzellinfiltrate im Azinuszgewebe und eine periduktale Fibrose.

Die Pathogenese der AIP ist noch zu großen Teilen unbekannt. Insbesondere die Rolle der zellulären Immunantwort ist nicht bis ins Detail geklärt. Durch adoptive Zelltransferversuche an MRL/MpJ-Mäusen sollten mit den beschriebenen Versuchen neue Erkenntnisse auf diesem Gebiet erlangt werden. Für Untersuchungen dieser Art hat sich besonders die MRL/MpJ-Maus als Modell bewährt, da vor allem weibliche Tiere dieses Stammes spontan eine AIP entwickeln [57, 58, 74, 75]. Die spontane Entstehung der Krankheit beginnt bei den Weibchen ab einem Alter von ca. 24 Wochen und die Inzidenz liegt ab einem Alter von ca. 34 Wochen bei 74 % [74]. Durch die Gabe von Poly I:C oder IFN- $\gamma$  kann das Auftreten der ersten Anzeichen beschleunigt und die Schwere der AIP insgesamt erhöht werden [58, 76]. Die murine AIP ähnelt dem Bild einer humanen AIP Typ 1. Bereits 1992 konnte gezeigt werden, dass sich die AIP von erkrankten Tieren des MRL/MpJ-Mausstammes auf gesunde, aber suszeptible Tiere desselben Stammes übertragen lässt [74]. Die murine AIP erfüllt damit ein

wichtiges Kriterium für autoimmune Erkrankungen. Für die Übertragung wurden unaufgereinigte Milzzellen verwendet. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass der Transfer von Serum nicht ausreichend war, um die AIP zu transferieren [74]. Prozesse der zellulären Immunität scheinen also in der Pathogenese der AIP eine Rolle zu spielen, während die humorale Immunität in der Initiierung der AIP möglicherweise entbehrlich ist. Um im Vergleich zur vorhandenen Literatur neue Erkenntnisse zu erlangen, wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene T-Lymphozyten-Subpopulationen und DZs isoliert und diese dann einzeln von erkrankten auf gesunde susceptible Tiere transferiert. Es konnten zwei T-Lymphozyten-Subpopulationen identifiziert werden, die in der Lage sind, die murine AIP bei MRL/MpJ-Mäusen zu übertragen.

### **5.1 Adoptiver Transfer verschiedener Zellpopulationen**

Die Transferversuche der verschiedenen Zellpopulationen liefen stets nach dem gleichen Versuchsaufbau ab (Abbildung 2): Milzzellen oder KM wurden aus Spendertieren des MRL/MpJ-Stammes gewonnen. Bei den Versuchsgruppen waren die weiblichen Spendertiere mindestens 37 Wochen alt und hatten einen durchschnittlichen AIP-Score von 3 (Tabelle 2). Bei den Vergleichsgruppen variierten diese Kriterien unter Umständen. Aus den Milzzellen oder dem KM wurden dann die gewünschten Zellpopulationen isoliert und kultiviert. Die Dauer der Kultivierung hing dabei von der Art der entsprechenden Zellpopulation ab. Nach Beendigung der Zellkultur wurden die verschiedenen T-Lymphozyten-Subpopulationen oder DZs in ca. 9 Wochen alte weibliche MRL/MpJ-Mäuse transferiert. Auch diese Angaben unterschieden sich bei den Vergleichsgruppen eventuell. Durch eine leicht abgewandelte Fragestellung waren das Alter der Spender- und Empfängertiere und die Höhe des AIP-Scores der Spendertiere bei dem Transfer von T<sub>regs</sub> ebenfalls unterschiedlich. 6 Wochen nach dem Zelltransfer wurden die Pankreata hinsichtlich ihres AIP-Scores mittels histologischer Untersuchungen beurteilt.

#### **5.1.1 Anzeichen der AIP bei MRL/MpJ-Mäusen**

Die folgenden Angaben beziehen sich auf alle Versuchs- und Vergleichsgruppen außer den Gruppen für den Transfer von Milzzellen aus jungen Spendertieren und T<sub>regs</sub> und der entsprechenden Vergleichsgruppe. Der durchschnittliche AIP-Score der für die Versuche verwendeten Spendertiere betrug  $2,9 \pm 0,1$ . Die Zellen nicht erkrankter Tiere (AIP-Score < 2) wurden für die Transferversuche nicht verwendet. Da die Inzidenz der AIP bei den MRL/MpJ-Mäusen nicht 100 % beträgt [74], wurden in jeder Versuchsrunde die Zellen von mehr Spendertieren gewonnen, als rein rechnerisch nötig waren. Die Inzidenz der AIP in den

vorliegenden Versuchen wurde nicht systematisch untersucht. Schätzungsweise lag sie aber bei über 90 %. In Anbetracht des relativ hohen Alters einiger Spendertiere (> 40 Wochen, Tabelle 2) liegt dies im Rahmen des Erwarteten.

Alle verwendeten Tiere zeigten also Anzeichen für eine AIP. Die histologischen Befunde (s. auch Abbildung 3) entstanden bei den Tieren spontan und ohne Manipulation. Das Modell der murinen AIP bei MRL/MpJ-Mäusen konnte demnach anhand der für die Versuche genutzten Tiere bestätigt werden. Die murine AIP bei MRL/MpJ-Mäusen kann durch die Gabe von Poly I:C oder IFN- $\gamma$  verstärkt werden [58, 76]. In der vorliegenden Arbeit wurde bewusst auf die Gabe zusätzlicher Substanzen zur Induktion der AIP verzichtet. Da sich die Untersuchungen auf Prozesse der zellulären Immunität bezogen, sollte die Entstehung der AIP in den Mäusen so natürlich wie möglich ablaufen. Besonders IFN- $\gamma$  spielt bei der zellulären Immunität von Autoimmunerkrankungen eine entscheidende Rolle. Viele autoimmune Entzündungen sind auf eine Überproduktion von IFN- $\gamma$  zurückzuführen [87]. Die pro-inflammatorischen Eigenschaften des Zytokins sorgen für die überschießende Immunreaktion. Eine Gabe von IFN- $\gamma$  könnte möglicherweise auch das Ausmaß der Entzündung bei den Empfängertieren beeinflussen. Auch Poly I:C kann die Produktion verschiedener Zytokine verändern und zusätzlich die Bildung von Th1 induzieren [88]. Ein verändernder Effekt auf die Pathogenese der AIP konnte somit nicht ausgeschlossen werden. Durch die vergleichsweise hohe geschätzte Inzidenz bei den Versuchstieren konnte der Vorteil der beschleunigten und gesteigerten AIP, den die Gabe von Poly I:C oder IFN- $\gamma$  mit sich bringt, ausgeglichen werden.

Zur Überprüfung des Versuchsaufbaus gab es, neben den bereits erwähnten Vergleichsgruppen, eine Kontrollgruppe. Diese bestand aus Empfängertieren, die durchschnittlich in dem gleichen Alter waren, wie die Tiere der Versuchs- und Vergleichsgruppen ( $9,5 \pm 0,5$  Wochen, Tabelle 2). Die Hälfte dieser Empfängertiere erhielt keinerlei Manipulation, der anderen Hälfte wurde PBS statt Zellen in die Schwanzvene injiziert. Da die Verfahren in der Auswertung keine Unterschiede ergaben, wurden die Tiere zu einer Gruppe zusammengefasst. Die Kontrollgruppe wurde nach der 6-wöchigen Beobachtungszeit mit einem durchschnittlichen AIP-Score von  $0,7 \pm 0,2$  bewertet (Abbildung 6). Die Tiere dieser Gruppe befanden sich dann in einem Alter von ca. 15 Wochen und entwickelten nur sehr wenig Anzeichen einer AIP oder waren sogar gesund. Dies unterstreicht zum einen erneut die schon bekannten Angaben zum MRL/MpJ-Mausmodell (Entwicklung von Anzeichen einer AIP ab einem Alter von ca. 24 Wochen).



Zum anderen konnte mit dem Transfer von PBS gezeigt werden, dass die reine Manipulation der Tiere nicht ursächlich für die Immunzellinfiltrate im Pankreas ist.

#### 5.1.1.1 Geschlechterverteilung der AIP

Die meisten der beschriebenen Daten wurden an weiblichen MRL/MpJ-Mäusen erhoben. Da die Inzidenz der murinen AIP bei den Männchen bekanntermaßen niedriger ist [74, 75], wurde auf eine Untersuchung männlicher Spendertiere verzichtet. Lediglich bei einer Vergleichsgruppe wurde der Transfer von Milzzellen aus erkrankten Weibchen auf männliche MRL/MpJ-Empfängertiere durchgeführt. Die Männchen erhielten im Durchschnitt einen AIP-Score von  $1,2 \pm 0,2$  (Abbildung 6). Dieser Wert war gegenüber der Kontrollgruppe leicht erhöht, aber statistisch nicht signifikant. Interessanterweise war der AIP-Score der männlichen Empfängertiere niedriger als der AIP-Score der weiblichen Empfängertiere, die die gleiche Menge an Milzzellen transferiert bekamen. Dies deutet darauf hin, dass zwar prinzipiell alle Tiere des MRL/MpJ-Stammes anfällig für die Ausprägung einer AIP sind, die weiblichen MRL/MpJ-Mäuse jedoch eine geschlechtsspezifisch höhere Anfälligkeit aufweisen. Eine Erweiterung der Arbeit durch Untersuchungen an zusätzlichen männlichen MRL/MpJ-Mäusen wäre wünschenswert.

Gründe für die geschlechterspezifischen Unterschiede sind nicht bekannt und wurden bisher nicht systematisch untersucht. Die bislang veröffentlichten Arbeiten an MRL/MpJ-Mäusen weisen auf den Fakt lediglich hin [57, 58, 74–76, 81]. Genetische Analysen des MRL/MpJ-Mausstammes, mit dem Ziel Suszeptibilitätsgene der AIP zu finden, deuteten nicht auf X- oder Y-chromosomal-lokalisierte Gene hin [77, 78]. Das Eingreifen in das Immunsystem durch die Gabe von Poly I:C oder IFN- $\gamma$  verringert die geschlechterspezifischen Unterschiede [58, 76]. In anderen Mausmodellen scheint es den Geschlechterunterschied nicht zu geben [71, 72]. Allerdings erfolgte bei diesen Mausmodellen immer eine genetische Veränderung der Tiere.

Die Geschlechterverteilung bei Mäusen unterscheidet sich von der Verteilung im Menschen: vor allem von der AIP Typ 1 sind Männer häufiger betroffen als Frauen [45, 89]. Auch die Gründe hierfür sind nicht bekannt.

#### 5.1.2 Transfer von Milzzellen

Kanno *et al.* bewiesen bereits, dass unaufgereinigte Milzzellen die Fähigkeit besitzen, die murine AIP von erkrankten auf susceptible MRL/MpJ-Mäuse zu übertragen [74]. Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen diese Aussagen. Milzzellen, die aus an AIP-erkrankten MRL/MpJ-Weibchen gewonnen wurden (AIP-Score  $\geq 2$ ) und in gesunde Weibchen desselben

Stammes transferiert wurden, erhöhten den durchschnittlichen AIP-Score im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant (AIP-Scores  $2,2 \pm 0,2$  versus  $0,7 \pm 0,2$ ;  $p = 0,018$ ; Abbildung 6). Damit konnten die Ergebnisse von Kanno *et al.* reproduziert und gleichzeitig der Beweis erbracht werden, dass das Transfermodell der murinen AIP bei MRL/MpJ-Mäusen unter den konkreten lokalen Gegebenheiten funktioniert.

Durch weitere Vergleichsgruppen war es zusätzlich möglich, die Kenntnisse zu dem Transfer von Milzzellen zu erweitern. So wurden z.B. Milzzellen aus jüngeren weiblichen MRL/MpJ-Mäusen gewonnen und transferiert (Tabelle 2). Die Spendertiere zeigten nachweislich keine Anzeichen für eine murine AIP (AIP-Score  $0,2 \pm 0,2$ ). Ein Transfer dieser Zellen führte bei den Empfängertieren zu einem durchschnittlichen AIP-Score von  $1,8 \pm 0,4$ . Dieser Wert liegt unter dem Wert der Empfängertiere, die Milzzellen erkrankter Spendertiere erhalten haben. Die murine AIP bei MRL/MpJ-Mäusen wird also scheinbar nur nach Ausbruch der Erkrankung bei den Spendertieren effektiv übertragen. Dennoch war der AIP-Score dieser Vergleichsgruppe höher als der AIP-Score der Kontrollgruppe, wenngleich keine statistische Signifikanz erreicht wurde. Die Milzzellen der „gesunden“ Spendertiere scheinen also weniger wirkungsvoll als die Milzzellen der „kranken“ Spendertiere bei der Übertragung der AIP zu sein. Trotzdem sind sie mutmaßlich bereits Teil der Pathogenese der AIP, da sie im Vergleich zur Kontrollgruppe zu vermehrten Anzeichen von AIP führten.

Möglicherweise reichte durch die eventuell verringerte Wirkung der Milzzellen der „gesunden“ Spendertiere deren Anzahl nicht mehr aus. Diese Annahme wird durch die Daten einer weiteren Vergleichsgruppe gestützt. Die Ausbeute an  $CD4^+CD44^{\text{high}}$  T-Zellen war so gering, dass die Anzahl der transferierten Zellen reduziert werden musste. Eine entsprechende Vergleichsgruppe erhielt deshalb eine in gleichem Maße verringerte Anzahl an Milzzellen ( $2 \times 10^6$ , Tabelle 2). Der Transfer von weniger Milzzellen führte bei den Empfängertieren zu einem durchschnittlichen AIP-Score von  $1,7 \pm 0,3$ . Dieser Wert war erneut höher als der Wert der Kontrollgruppe, aber niedriger als der Wert der Gruppe, die mehr Milzzellen erkrankter Spendertiere erhielt. Da die Milzzellen, die in einer geringeren Anzahl transferiert wurden, ebenfalls aus erkrankten Spendertieren stammten, müssten sie ausreichend wirksam sein. Scheinbar sorgt also die verringerte Anzahl für den geringeren Wirkungsgrad der Zellen. Der Einfluss der Menge der transferierten Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit nicht systematisch untersucht.

#### 5.1.2.1 Extrapankreatische Immunzellinfiltrate

Entlang der eben geführten Argumentation könnte geschlussfolgert werden, dass alleine die hohe Anzahl ( $5 \times 10^6$ ) an transferierten Immunzellen Grund für die Ausprägung von Entzündungen ist. Der Transfer der Zellen erfolgte allerdings in die Schwanzvene, während die Entzündungsanzeichen ausschließlich im Pankreas gefunden wurden. Da bekannt ist, dass eine AIP sowohl bei Mäusen als auch bei Menschen zu Entzündungsherden in anderen Organen führt [35, 57], wurden auch Lebern und Nieren der Empfängertiere histologisch begutachtet. 20 % bzw. 30 % der Empfängertiere der Kontrollgruppe zeigten dabei Immunzellinfiltrate in der Leber bzw. in den Nieren. MRL/MpJ-Mäuse sind nicht nur ein etabliertes Modell für die AIP, sondern neigen generell zu Autoimmunität [90]. Daher ist das Vorhandensein von Immunzellinfiltraten bei einer so geringen Anzahl von Tieren nicht überraschend, obwohl diese Tiere in Bezug auf eine AIP als „gesund“ galten. Der Transfer von Milzzellen veränderte das Bild in Lebern und Nieren nicht (Abbildung 9), obwohl diese Empfängertiere deutliche Anzeichen einer AIP aufwiesen. Die Milzzellen scheinen also in dem gegebenen Versuchsaufbau einen spezifischen Einfluss auf das Pankreas zu haben.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit müssten für eine umfassendere Aussage zu extrapankreatischen Manifestationen der murinen AIP bei MRL/MpJ-Mäusen ausgedehnt werden. So wurden z.B. weder die Gallengänge noch die Därme der Tiere untersucht, obwohl von der humanen AIP bekannt ist, dass diese oft mit einer sklerosierenden Cholangitis [45] oder Colitis Ulcerosa (vor allem AIP Typ 2; [47]) assoziiert ist. Auch das gemeinsame Auftreten mit dem Sjögren-Syndrom wurde beschrieben [44].

#### 5.1.3 Transfer von $CD3^+$ , $CD3^+CD4^+$ und $CD3^+CD8^+$ T-Zellen

Der erfolgreiche Transfer der murinen AIP durch Milzzellen und damit die Wiederholung der Ergebnisse von Kanno *et al.* [74] waren wichtige Schritte in der Etablierung der Transferversuche, führten aber bis dahin nicht zu neuen Erkenntnissen. Milzzellen bestehen aus einer Vielzahl verschiedener Zellarten, vor allem aber aus  $CD3CD4$ - und  $CD3CD8$ -doppelt-positiven T-Lymphozyten sowie  $CD19$ -positiven B-Lymphozyten (Abbildung 4 a). Um die Aussage über die Transferfähigkeit verschiedener Zellpopulationen konkretisieren zu können, wurden in einem nächsten Schritt zunächst alle  $CD3^+$  T-Zellen, sowie  $CD3^+CD4^+$  und  $CD3^+CD8^+$  T-Zellen aus den Milzzellen isoliert. Die nun reinen Populationen (Abbildung 4 b-d) wurden in einem gleichen Versuchsaufbau wie bei den Milzzellen transferiert.

Bemerkenswert dabei war, dass der Transfer von  $CD3^+$  T-Zellen zu einem durchschnittlichen AIP-Score von  $2,3 \pm 0,3$  bei den Empfängertieren führte. Dieser Wert war gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht ( $p = 0,036$ ) und in etwa genauso hoch wie der Wert der „Milzzellen-Transfergruppe“ (Abbildung 6). Zum ersten Mal konnte damit gezeigt werden, dass T-Lymphozyten die murine AIP bei MRL/MpJ-Mäusen genauso effektiv transferieren können wie unaufgeklärte Milzzellen. Unter den gegebenen experimentellen Bedingungen sind die T-Zell-vermittelten Prozesse der zellulären Immunität nötig und vor allem ausreichend, um die Erkrankung zu übertragen. Diese Annahme wird auch von anderen experimentellen Arbeiten unterstützt. Während z.B. der Transfer eines Amylase-spezifischen Antiserums bei Ratten nicht ausreichend war, um eine experimentelle AIP zu induzieren, waren Amylase-spezifische T-Zellen in der Lage, die Erkrankung zu transferieren [69]. Veränderungen von DZs in C57BL/6-Mäusen führten zu einem Anstieg von auto-reaktiven T-Zellen [71] und auch im MRL/MpJ-Modell konnte eine gesteigerte Aktivität von T-Zellen nachgewiesen werden [57, 75]. In der humanen AIP wurde das Vorhandensein von T-Zellen innerhalb des Pankreasgewebes ebenfalls mehrfach beschrieben [45, 46, 55, 56].

Wie zuvor bei dem Transfer von Milzzellen wurde auch bei dem Transfer von  $CD3^+$  T-Zellen das Auftreten von Immunzellinfiltraten in Lebern und Nieren begutachtet. Obwohl die Empfängertiere deutliche Anzeichen einer AIP aufwiesen, waren nur bei 10-20 % der Tiere Zellinfiltrate in der Leber oder den Nieren zu sehen (Abbildung 9). Ähnlich wie die Milzzellen scheinen auch die  $CD3^+$  T-Zellen einen spezifischen Effekt auf das Pankreas zu haben.

Die meisten Studien in Maus und Mensch zeigen, dass vor allem  $CD4^-$  und  $CD8^-$  positive T-Zellen im exokrinen Pankreasgewebe gefunden werden können [49, 55, 57, 77]. Entsprechend wurden in der vorliegenden Arbeit auch die Effekte dieser beiden T-Zellpopulationen in den Transferversuchen einzeln betrachtet. Die  $CD3^+CD4^+$  bzw.  $CD3^+CD8^+$  T-Zellen führten bei den Empfängertieren zu AIP-Scores von  $1,6 \pm 0,3$  bzw.  $1,9 \pm 0,3$ . Diese Werte waren jeweils höher als bei der Kontrollgruppe, allerdings ohne statistische Signifikanz zu erreichen (Abbildung 6). Zusätzlich waren die AIP-Scores niedriger als die AIP-Scores der Empfängertiere, die Milzzellen oder  $CD3^+$  T-Zellen injiziert bekamen. Interessanterweise war also keine dieser beiden  $CD3^-$ -Subpopulationen alleine in der Lage, eine murine AIP im MRL/MpJ-Mausmodell zu transferieren. Scheinbar ist ein Zusammenspiel beider Zellarten für die Entstehung einer AIP entscheidend.

Besonders die  $CD3^+CD4^+$  T-Zellen wurden als vielversprechende Überträger der Erkrankung angesehen, da erst kürzlich gezeigt wurde, dass eine besondere Gruppe der  $CD4^-$ -positiven

T-Lymphozyten in der humanen AIP von entscheidender Bedeutung sein könnte: CD4-positive zytotoxische T-Lymphozyten (*cytotoxic T-lymphocytes*, CTL). Es konnte gezeigt werden, dass CTL bei Patienten mit IgG4-RD expandiert waren und unter anderem durch die Sekretion von IFN- $\gamma$  und TGF- $\beta$  zur Pathogenese der Erkrankung beitragen können [91].

#### 5.1.4 Transfer von CD4<sup>+</sup>CD44<sup>high</sup> T-Zellen

Eigene Vorarbeiten der Arbeitsgruppe lenkten den Fokus der weiteren Arbeiten zusätzlich auf eine weitere Untergruppe der CD4-positiven T-Zellen. Genetische Analysen an einer AIL führten zur Kartierung verschiedener QTLs [77]. Die relative Häufigkeit von CD4<sup>+</sup>/CD44<sup>high</sup> Gedächtnis-T-Zellen in der Milz korrelierte dabei mit dem Auftreten einer AIP. Zusätzlich überlappte das Auftreten der CD4<sup>+</sup>/CD44<sup>high</sup> T-Zellen bei einer AIP mit einem QTL der Genotyp-Phänotyp-Korrelationsanalysen [78].

In den durchgeführten Versuchen waren CD4<sup>+</sup>CD44<sup>high</sup> T-Zellen in der Lage, eine murine AIP bei MRL/MpJ-Mäusen zu transferieren. Die Zellen führten bei den Empfängertieren zu einem durchschnittlichen AIP-Score von  $2,2 \pm 0,3$  (Abbildung 7). Dieser Wert war signifikant höher als der AIP-Score der Kontrollgruppe ( $p = 0,027$ ). Bemerkenswerterweise war dieser Wert in etwa genauso hoch wie der Wert der Empfängertiere, die CD3<sup>+</sup> T-Zellen transferiert bekamen, obwohl die Anzahl der transferierten Zellen um die Hälfte reduziert werden musste ( $2 \times 10^6$  statt  $5 \times 10^6$  Zellen). Besonderen Stellenwert hat dieses Ergebnis zusätzlich durch den Fakt, dass der Transfer von  $2 \times 10^6$  Milzzellen die AIP weniger effektiv transferierte und zu einem niedrigeren durchschnittlichen AIP-Score führte (Abbildung 7).

Angereicherte CD4CD44-doppelt-positive und CD62L-negative Gedächtnis-T-Zellen (Abbildung 4 e) scheinen eine AIP effektiv übertragen zu können. Der Anteil dieser Zellen an den transferierten CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen war möglicherweise nicht groß genug, um wirkungsvoll zu sein. Im Gegensatz zu naïven T-Zellen werden Gedächtnis-T-Zellen durch den Kontakt mit AGs aktiviert [92]. Gedächtnis-T-Zellen können in zwei verschiedene Gruppen unterteilt werden: zentrale Gedächtnis-T-Zellen (*central memory T-cells*, T<sub>CM</sub>) und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (*effector memory T-cells*, T<sub>EM</sub>). Während T<sub>CM</sub> durch eine hohe proliferative Kapazität große Mengen an Effektorzellen generieren können, sind T<sub>EM</sub> für die lokale Immunantwort im Gewebe verantwortlich [92, 93], indem sie unter anderem IFN- $\gamma$  und IL-4 produzieren [94, 95]. Mit der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass T<sub>EM</sub> eine funktionelle Rolle in der Pathogenese der murinen AIP besitzen könnten.

#### 5.1.4.1 Zusammensetzung der Immunzellinfiltrate

Die scheinbar verschieden starke Wirkungsweise der unterschiedlichen T-Lymphozyten-Subpopulationen führte zu der Fragestellung, ob die Auswirkungen in den betroffenen Geweben ebenfalls variabel sind. Zur Adressierung dieser Überlegung wurden in den Pankreata der Empfängertiere die CD3-, CD4- CD8- und CD44-positiven Zellen mittels immunhistochemischer Methoden angefärbt. Die Pankreata der Tiere, die keinen Zelltransfer erhielten, dienten dabei erneut als Kontrolle. Der Transfer von Milzzellen und verschiedenen T-Lymphozyten-Subpopulationen führte zu keinen Unterschieden in der Zusammensetzung der pankreatischen Immunzellinfiltrate (Abbildung 8). Die transferierten Zellen scheinen also nicht selbst das Pankreas zu infiltrieren, sondern vielmehr eine Immunreaktion in den Mäusen hervorzurufen, die dann in der Folge zu den entzündlichen Herden im Pankreas führt. Zur Überprüfung dieser Hypothese müssten die transferierten Zellen markiert werden, um am Versuchsende lokalisiert werden zu können. Eine Zellmarkierung in *in vivo* Versuchen findet üblicherweise mit Carboxy-Fluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester (CFSE) statt [96]. Besonders die Teilung der Lymphozyten kann damit dokumentiert werden. Eine Markierung der zu transferierenden Zellen mit CFSE würde also möglicherweise eine Lokalisation der Zellen erlauben. Allerdings bleibt fraglich, ob die Anzahl der Zellen für eine solche Versuchsreihe eventuell massiv erhöht werden müsste. Erste eigene Pilotstudien zur CFSE-Markierung wurden bereits realisiert, führten aber bisher zu keinen auswertbaren Ergebnissen.

#### 5.1.5 Transfer von T<sub>regs</sub>

Der Fokus wurde durch eigene Arbeiten der Arbeitsgruppe neben den T<sub>EM</sub> auf regulatorische T-Zellen gelenkt. So konnte z.B. am MRL/MpJ-Mausmodell gezeigt werden, dass eine Blockade von CTLA4 die Funktion von T<sub>regs</sub> reduziert und somit die Aktivität von Effektor-T-Zellen gesteigert ist [57]. Außerdem wurde im Mausmodell gezeigt, dass die therapeutischen Effekte von Rapamycin (ein mTOR-Signalweg-Inhibitor) auf eine Aktivierung von T<sub>regs</sub> und die damit einhergehende Unterdrückung der Effektor-T-Zell-Aktivität zurückzuführen sind [57]. Auch in den bereits erwähnten genetischen Studien an einer AIL konnten T<sub>regs</sub> mit der AIP in Zusammenhang gebracht werden: zwei QTLs der AIP überlappten mit einem QTL für FoxP3-positive T<sub>regs</sub> [78].

Regulatorische T-Zellen besitzen vor allem inhibitorische Eigenschaften [59]. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit überprüft werden, ob der Transfer von T<sub>regs</sub> möglicherweise zu einer Verlangsamung oder vollständigen Inhibition der Progression der AIP bei MRL/MpJ-Mäusen führt. Dazu wurden CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> aus MRL/MpJ-Spendertieren isoliert, die bereits

Anzeichen einer AIP aufwiesen, sich aber noch in der anfänglichen Progressionsphase der Erkrankung befanden. Die Zellen wurden dann auf Tiere desselben Alters transferiert. Eine Vergleichsgruppe mit Tieren in der gleichen Altersgruppe erhielt keinen Zelltransfer. Der Transfer von  $CD4^+CD25^+$   $T_{regs}$  führte unter den gegebenen experimentellen Umständen nicht zu einer Inhibition der murinen AIP. Die Vergleichsgruppe, die PBS statt Zellen erhielt, entwickelte einen durchschnittlichen AIP-Score von  $2,3 \pm 0,1$ . Der Transfer der  $T_{regs}$  reduzierte den AIP-Score auf  $1,6 \pm 0,4$ . Diese Veränderung war allerdings nicht signifikant.

Möglicherweise sind  $T_{regs}$  zwar durchaus notwendig, um den Verlauf der AIP zu inhibieren, aber nicht alleine ausreichend für diesen Prozess. Denkbar ist auch, dass die endogen vorhandenen regulatorischen T-Zellen nicht der limitierende Faktor in diesem Modell sind und eine Steigerung der Anzahl der Zellen durch einen Transfer daher keinen Effekt hat. Eventuell wäre auch eine höhere Anzahl von  $T_{regs}$  nötig gewesen: da die Ausbeute der Zellen gering war, wurde die Menge der zu transferierenden Zellen auf  $2,5 \times 10^6$  verringert. Außerdem ist es nicht möglich, FoxP3-positive Zellen anhand dieses Markers zu isolieren. Da FoxP3 ein intrazellulär exprimiertes Protein ist, kann es nicht als Isolationsmarker verwendet werden, ohne die Zellen zu zerstören. Die Isolation von  $CD4^+CD25^+$   $T_{regs}$  diente als Hilfsmittel, führte aber nur zu einer FoxP3-angereicherten Population, bei der es auch FoxP3-negative Zellen gab (Abbildung 4 f). Die bisher beschriebenen Effekte von  $T_{regs}$  gehen ausdrücklich auf FoxP3-positive  $T_{regs}$  zurück [57, 78, 81]. Möglicherweise war der Anteil dieser speziellen Untergruppe in den vorliegenden Experimenten nicht ausreichend, um effektiv wirken zu können. Zusätzlich könnte eine Optimierung des Versuchsaufbaus nötig sein. Sowohl das Alter der Spender- und Empfängertiere, als auch der Zeitpunkt der Behandlung mit  $T_{regs}$  könnten variiert werden. Eventuell war auch der Zeitpunkt der Auswertung zu früh gewählt und die Effekte wären erst später zu beobachten gewesen.

#### 5.1.6 Transfer von DZs

Als AG-präsentierende Zellen sind DZs Teil der zellulären Immunantwort. Dass DZs möglicherweise in der Pathogenese der murinen AIP eine Rolle spielen könnten, wurde durch verschiedene Arbeiten gezeigt. DZs, bei denen die TGF- $\beta$ -Signalkaskade blockiert wurde, verloren die Immuntoleranz gegenüber körpereigenen pankreatischen AGs und steigerten so die T-Zell-Aktivität, was in eine murine AIP mündete [71]. Eigene Vorarbeiten zur Charakterisierung von DZs bei MRL/MpJ-Mäusen ergaben, dass die DZs älterer Tiere einen reifen Phänotyp aufwiesen und dass ein Ungleichgewicht in der DZ-Aktivierung möglicherweise in der Pathogenese der AIP eine Rolle spielen könnte [79]. Außerdem waren

bei Genotyp-Phänotyp-Korrelationsanalysen unter anderem die Gene *CLEC4A2* (ein negativer Regulator auf DZs) und *cytohesin-interacting protein* (*CYTIP*, Regulator der DZ-T-Zell-Interaktion [97]) in den QTLs lokalisiert [78].

Prinzipiell sind DZs im Pankreasgewebe vorhanden, aber die aus Gewebe isolierte Zellmenge würde für die beschriebenen Versuche nicht ausreichen. Zusätzlich war es in der vorliegenden Arbeit nicht möglich, das gesamte Pankreas für die Isolation der DZs zur Verfügung zu stellen, da die histologischen Untersuchungen des Organs ein essenzieller Bestandteil der Versuche waren. Daher wurde eine etablierte *in vitro* Generierung der DZs aus KM gewählt [82]. Die durchflusszytometrische Überprüfung der Oberflächenmoleküle zeigte reife DZs (Abbildung 5). Die transferierten DZs führten bei den MRL/MpJ-Empfängertieren zu einem durchschnittlichen AIP-Score von  $1,8 \pm 0,1$  (Abbildung 11). Dieser Wert lag über dem Wert der Kontrollgruppe, erreichte aber keine statistische Signifikanz. Unter den gegebenen experimentellen Bedingungen waren DZs nicht in der Lage, eine murine AIP bei MRL/MpJ-Mäusen zu transferieren.

Es sei darauf hingewiesen, dass die *in vitro* Generierung, die in der vorliegenden Arbeit angewendet wurde, durch die Stimulation der KM-Zellen mit GM-CSF zur Bildung von kDZs und pDZs führen kann [65, 82]. Beide Zellarten unterscheiden sich durch die Produktion verschiedener Zytokine [65]. pDZs sind im Gegensatz zu kDZs CD11c-negativ [65]. Die in den Versuchen verwendeten DZs bestanden zu fast 100 % aus CD11c-positiven kDZs (Abbildung 5). In weiterführenden Versuchen wäre es wünschenswert, auch pDZs zu transferieren, um eine differenzierte Aussage über die Effekte dieser Zellart treffen zu können. Für pDZs wurde eine mögliche Beteiligung in der Pathogenese der murinen AIP bereits gezeigt: ein Ausschalten von pDZs führte durch eine verminderte IFN- $\alpha$ -Produktion zu der Entstehung einer murinen AIP im MRL/MpJ-Mausmodell [68]. pDZs konnten auch im Menschen in Verbindung mit autoimmunen Erkrankungen gebracht werden [98].

## **5.2 Limitationen des verwendeten Transfermodells bei MRL/MpJ-Mäusen**

Die murine AIP der MRL/MpJ-Mäuse spiegelt die humane AIP Typ 1 in einigen wichtigen Merkmalen wider. Die Entzündung im Tiermodell geht ebenfalls vom exokrinen Gewebe des Pankreas aus und beinhaltet eine Zerstörung der Azinuszellstrukturen und einen fibrotischen Umbau. Die endokrinen Inselzellstrukturen sind größtenteils nicht von der Entzündung betroffen. Zusätzlich wurden die dichten Immunzellinfiltrate aus T- und B-Lymphozyten und Plasmazellen sowohl für Mensch als auch für Maus beschrieben [49, 68, 75, 77]. Dennoch birgt das verwendete Mausmodell auch Nachteile. Die unterschiedliche



Geschlechterverteilung der Erkrankung wurde bereits angesprochen (Abschnitt 5.1.1.1). Die wohl größte Limitation ist allerdings das Fehlen von IgG4 bei Mäusen. Besonders die Einordnung der AIP als Teil der IgG4-RD verdeutlicht diesen Nachteil. Beim Menschen bildet IgG4 unter physiologischen Umständen den kleinsten Teil der G-Immunglobuline und ist neben IgG1, IgG2 und IgE bei Patienten mit IgG4-RD erhöht [99]. Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass IgM, IgA sowie deren Verhältnis zu IgG bei Patienten mit AIP reduziert sind [100]. Diese Eigenschaften sind auch im Mausmodell nachweisbar, sodass das Fehlen von IgG4 teilweise ausgeglichen werden könnte, indem die anderen Anteile der Immunglobuline analysiert werden.

Auch der Versuchsaufbau selbst beinhaltet Besonderheiten, die für das Modell der murinen AIP eventuell von Nachteil sein könnten. In Anlehnung an die Arbeiten von Kanno *et al.* [74] und um deren Ergebnisse detailgetreu reproduzieren zu können, wurden zwei Schritte während der Experimente durchgeführt, die nachfolgend kritisch betrachtet werden: die Stimulation der T-Zellen mit PHA und die Vorbehandlung der Empfängertiere mit Cyclophosphamid. Als unspezifisches Mitogen regt PHA die Zellteilung von T-Lymphozyten an und sorgt damit für eine Aktivierung der Zellen. Möglicherweise begünstigt diese Stimulation der Zellen auch die Übertragung der Erkrankung. Allerdings wurden in den beschriebenen Versuchen alle transferierten Zellen stimuliert, aber nicht alle Zellen führten auch zu einer Übertragung der AIP. Dennoch wäre eine Versuchsreihe mit unstimulierten Zellen nötig, um eine Aussage zu dem Effekt von PHA in dem beschriebenen Versuchsdesign treffen zu können. Der Einsatz von Cyclophosphamid bei Empfängertieren von Zellen ist verbreitet. Cyclophosphamid soll das „Anwachsen“ der Zellen erleichtern [101] und das Immunsystem durch eine Verminderung von T<sub>regs</sub> schwächen [101–103]. Welchen Einfluss genau das Cyclophosphamid nach 7 Tagen auf das System der zellulären Immunität in den Empfängertieren hat, ist dabei nicht bekannt. Eine Beeinflussung ist aber wahrscheinlich. Wünschenswert wäre daher eine Versuchsreihe mit dem Transfer der Zellen, ohne die Empfängertiere vorher mit Cyclophosphamid zu behandeln. Da die Stilllegung des Immunsystems der Empfängertiere dann fehlen würde, müsste wahrscheinlich die Anzahl der zu transferierenden Zellen deutlich erhöht werden.

Die histologischen Beurteilungen vor allem des Pankreasgewebes der Spender- und der Empfängertiere wurden so objektiv und ausgedehnt wie möglich durchgeführt. Dennoch ist auch dieser Teil des Versuchsaufbaus eine potenzielle Fehlerquelle. Das Pankreas musste zerteilt werden, um möglichst viele Untersuchungen zu gewährleisten. Somit konnten sowohl der H&E- als auch der CD3-Score jeweils nur an einem Teil des Organs erhoben werden. Um

das Problem zu minimieren, wurden pro Score jeweils mindestens 4 Gewebeschnitte beurteilt, dennoch konnte das Pankreas nicht in der Gänze bewertet werden. Durch technische Fehler (z.B. Fehlschnitte) konnte ein Verlust von Abschnitten des Gewebes nicht ausgeschlossen werden. Dadurch ist es theoretisch möglich, dass Entzündungsherde übersehen wurden, die sich in einer anderen Ebene des Organs befanden.

Auch die Länge der Versuchsdauer muss kritisch betrachtet werden. Nach dem Transfer der Zellen in 9 Wochen alte Tiere folgte eine 6-wöchige Beobachtungszeit. Zum Zeitpunkt der histologischen Beurteilung der Organe waren die Empfängertiere also ca. 15 Wochen alt. In Anbetracht der Tatsache, dass in der Literatur ein Alter von ca. 24 Wochen als „Startpunkt“ für die Ausprägung einer AIP angegeben wird, erschien ein Alter von 15 Wochen als geeignet. So konnte mit einer hohen Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass Immunzellinfiltrate nicht spontan, sondern durch den Transfer der Zellen auftraten. Der niedrige durchschnittliche AIP-Score der Kontrollgruppe stützt diese Annahme. Dennoch wurde der Beobachtungszeitraum in Anlehnung an die Arbeiten von Kanno *et al.* gewählt und könnte überdacht werden. Vor allem extrapankreatische Beteiligungen benötigen unter Umständen mehr Zeit zur Manifestation.

Weitere Optimierungen verschiedener Aspekte des Versuchsaufbaus wären zusätzlich denkbar und sinnvoll. Allerdings stößt eine Bearbeitung dieser durch eine exponentielle Erhöhung der Tierversuchszahl an objektive Grenzen. Außerdem darf nicht außer Acht gelassen werden, dass Tierversuche immer eine Modellfunktion besitzen und nicht die komplexe Situation der Erkrankung widerspiegeln können.

#### 5.2.1 Weitere Komponenten des Immunsystems

Der Fokus der Arbeit lag auf der Untersuchung des Einflusses von T-Zell-vermittelten Prozessen. Dennoch besteht die zelluläre Immunantwort aus weiteren Zellarten, deren Einfluss auf die Pathogenese der AIP ebenfalls entscheidend sein könnte. So wurde z.B. die Rolle von Makrophagen in der Pathogenese der AIP hervorgehoben [57, 58, 74, 75]. Besonders die pro-inflammatorischen Makrophagen vom Typ M1 könnten durch eine Aktivierung direkt zur Zerstörung des Pankreasparenchyms beitragen oder indirekt Antikörper-abhängige Zytotoxizität hervorrufen [74]. Auch im Menschen konnte ein Zusammenhang zwischen erhöhter Fibrogenese bei der AIP und dem vermehrten Auftreten von Makrophagen gezeigt werden [104].

Das Vorhandensein von neutrophilen Granulozyten im Pankreasgewebe, vor allem im Zusammenhang mit der AIP Typ 2, wurde beschrieben. Erst kürzlich wurde der

Zusammenhang zwischen der AIP und Neutrophilen im Pankreasgewebe von Mäusen näher untersucht [68]. Es konnte gezeigt werden, dass die neutrophilen Granulozyten sogenannte *neutrophile extracellular traps* (NETs, Neutrophile Extrazelluläre Fallen) produzieren, welche pDZs stimulieren können [105] und damit zur Produktion von IFN- $\alpha$  führen [68]. Das Auftreten von NETs war sowohl bei Mäusen als auch bei Menschen nachweisbar.

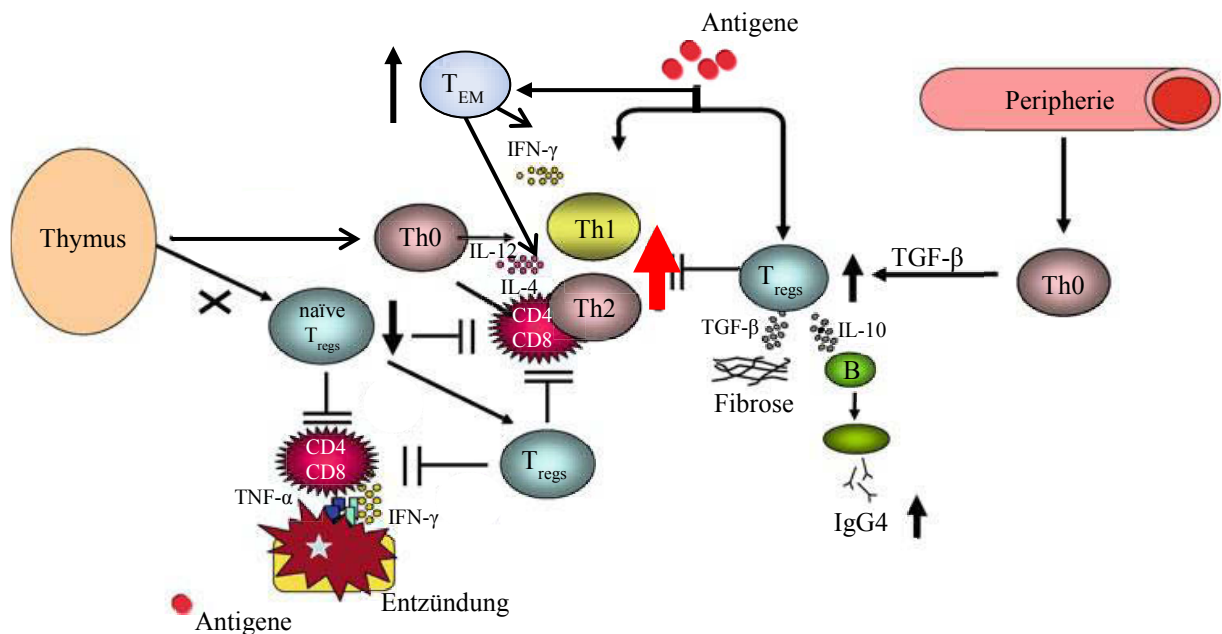
Die humoralen Komponenten der Immunantwort wurden in der vorliegenden Arbeit bewusst ausgeklammert. Das Auftreten von auto-AKs bei der humanen AIP ist bekannt [52–55]. Besonders im Zusammenhang mit der Klassifikation der AIP als pankreatische Manifestation der IgG4-RD rücken diese Komponenten wieder in den Fokus der Aufmerksamkeit. Aufgrund der Komplexität dieses Feldes war es in der vorliegenden Arbeit nicht möglich, sowohl die zelluläre als auch Teile der humoralen Immunantwort zu betrachten. Offensichtlich wird die Pathogenese der AIP aber durch die komplexen Zusammenhänge beider Immunitäten gesteuert und eine ausführliche Untersuchung dieser Zusammenhänge wäre wünschenswert und würde die Erkenntnisse erweitern.

### **5.3 Einordnung der vorliegenden Arbeit in den Stand der Forschung**

Die durchgeführten Experimente führten zu neuen Erkenntnissen der Rolle der zellulären Immunität bei der murinen AIP von MRL/MpJ-Mäusen. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl CD3<sup>+</sup> als auch CD4<sup>+</sup>CD44<sup>high</sup> T-Zellen in der Lage sind, eine murine AIP von erkrankten auf susceptible MRL/MpJ-Weibchen genauso effektiv wie Milzzellen zu übertragen. Die ausschlaggebenden T-Zellpopulationen, die verantwortlich für die Übertragung der AIP sind, konnten damit eingegrenzt werden. Besonders die Rolle der CD4<sup>+</sup>CD44<sup>high</sup> T<sub>EM</sub> scheint durch ihre gesteigerte Wirkung interessant und sollte in Folgestudien näher untersucht werden.

Über die Rolle der beiden T-Zell-Subpopulationen in der Pathogenese kann nur gemutmaßt werden, da funktionelle Untersuchungen auf zellulärer Ebene nicht Gegenstand dieser Arbeit waren. Denkbar wäre aber eine pathologisch gesteigerte Erinnerungsfunktion der Gedächtnis-T-Zellen an körpereigene AGs, was zu einer kontinuierlich gesteigerten Produktion von IFN- $\gamma$  und IL-4 führt. Dadurch wird zusätzlich der Anteil an CD3<sup>+</sup> T-Zellen erhöht, wobei möglicherweise ein Ungleichgewicht von CD3CD4- und CD3CD8-doppelt-positiven Zellen zur weiteren Progression der Erkrankung führt. In Abbildung 12 wurden diese Annahmen in das bestehende Konzept der Immunpathogenese der AIP integriert. Th1 und Th2, welche regulär aus naïven Th0 entstehen, erkennen möglicherweise vermehrt körpereigene AGs, da deren Regulation durch fehlende T<sub>regs</sub> entfällt. Die beschriebenen Ergebnisse führen zu der

Hypothese, dass auch T<sub>EM</sub> körpereigene AGs erkennen und ein gesteigertes Erinnerungsvermögen gegenüber diesen AGs ausbilden. Das führt zu einer gesteigerten Produktion von IFN- $\gamma$  und IL-4, was ebenfalls zur Induktion von Th1 und Th2 beiträgt. Diese wiederum produzieren Zytokine, die zu der Entzündungsreaktion führen. Außerdem könnte ein eventuelles Ungleichgewicht von Th1 und Th2 zusätzlich gefördert werden.



**Abbildung 12. Erweiterung des Konzepts der Immunpathogenese der AIP (modifiziert nach [45]).** Die in Abbildung 1 vorgestellte Hypothese über die Pathogenese der AIP kann durch die beschriebenen Ergebnisse ergänzt werden.  $CD4^+CD44^{high} T_{EM}$  weisen möglicherweise eine gesteigerte Erinnerungsfunktion gegenüber körpereigenen AGs auf und tragen so durch eine Produktion von  $IFN-\gamma$  und IL-4 zu dem Ungleichgewicht von Th1 und Th2 bei. Abkürzungen: B - B-Zelle, Th0 - naive T-Zellen, Th1/2 - T-Helferzellen Typ 1/2,  $T_{regs}$  - regulatorische T-Zellen,  $T_{EM}$  - Effektor-Gedächtnis-T-Zelle, CD - *cluster of differentiation*,  $IFN-\gamma$  - Interferon- $\gamma$ , IL - Interleukin, TGF- $\beta$  - *transforming growth factor*  $\beta$ , TNF- $\alpha$  - *tumor necrosis factor*  $\alpha$ , Ig - Immunglobulin.

Das bessere Verständnis der Pathogenese der autoimmunen Entzündung des Pankreas trägt letztendlich auch zu einer besseren Diagnostik bei. Zukünftig könnten die Erkenntnisse eventuell bei der Entwicklung neuer Medikamente zur Behandlung der AIP verwendet werden.

## 6. Literaturverzeichnis

1. **Robert Koch-Institut (RKI), Statistisches Bundesamt.** <http://www.gbe-bund.de> (Diagnosedaten der Krankenhäuser ab 2000, ICD10: K85, K86.0, K86.1), *zuletzt geprüft: 09.04.2018.*
2. **Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF (Leitlinienprogramm Onkologie).** S3-Leitlinie Exokrines Pankreaskarzinom: Langversion 1.0. 2013.
3. **Fokas E, O'Neill E, Gordon-Weeks A, Mukherjee S, McKenna WG, Muschel RJ.** Pancreatic ductal adenocarcinoma: From genetics to biology to radiobiology to oncoimmunology and all the way back to the clinic. *Biochimica et biophysica acta.* 2015; 1855: 61–82.
4. **Bailey P, Chang DK, Nones K, Johns AL, Patch A-M, Gingras M-C, et al.** Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature.* 2016; 531: 47 EP -.
5. **Malumbres M, Barbacid M.** RAS oncogenes: The first 30 years, Vol 6. England; 2003 Jun.
6. **Rozenblum E, Schutte M, Goggins M, Hahn SA, Panzer S, Zahurak M, et al.** Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer research.* 1997; 57: 1731–34.
7. **Vogelstein B, Lane D, Levine AJ.** Surfing the p53 network. *Nature.* 2000; 408: 307–10.
8. **Izeradjene K, Combs C, Best M, Gopinathan A, Wagner A, Grady WM, et al.** Kras(G12D) and Smad4/Dpc4 haploinsufficiency cooperate to induce mucinous cystic neoplasms and invasive adenocarcinoma of the pancreas. *Cancer cell.* 2007; 11: 229–43.
9. **Krantz SB, Shields MA, Dangi-Garimella S, Cheon EC, Barron MR, Hwang RF, et al.** MT1-MMP cooperates with Kras(G12D) to promote pancreatic fibrosis through increased TGF-beta signaling. *Molecular cancer research : MCR.* 2011; 9: 1294–304.
10. **Schutte M, Hruban RH, Geradts J, Maynard R, Hilgers W, Rabindran SK, et al.** Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas. *Cancer research.* 1997; 57: 3126–30.
11. **Kim WY, Sharpless NE.** The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell.* 2006; 127: 265–75.

12. **Zentrum für Krebsregisterkarten.**  
[https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Bauchspeicheldruesenkrebs/bauchspeicheldruesenkrebs\\_node.html](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Bauchspeicheldruesenkrebs/bauchspeicheldruesenkrebs_node.html), *zuletzt geprüft: 09.04.2018*.
13. **Robert Koch-Institut (RKI).** Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016.
14. **Banks PA, Freeman ML.** Practice guidelines in acute pancreatitis. *The American journal of gastroenterology*. 2006; 101: 2379–400.
15. **Banks PA, Bollen TL, Dervenis C, Gooszen HG, Johnson CD, Sarr MG, et al.** Classification of acute pancreatitis--2012: Revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus. *Gut*. 2013; 62: 102–11.
16. **Whitcomb DC, Frulloni L, Garg P, Greer JB, Schneider A, Yadav D, et al.** Chronic pancreatitis: An international draft consensus proposal for a new mechanistic definition. *Pancreatology*. 2016; 16: 218–24.
17. **Benjamin O, Lappin SL.** Pancreatitis, Chronic. In: StatPearls. Treasure Island (FL); 2018.
18. **Kleeff J, Whitcomb DC, Shimosegawa T, Esposito I, Lerch MM, Gress T, et al.** Chronic pancreatitis. *Nature Reviews Disease Primers*. 2017; 3: 17060 EP -.
19. **Hoffmeister A, Mayerle J, Beglinger C, Büchler MW, Bufler P, Dathe K, et al.** S3-Leitlinie Chronische Pankreatitis: Definition, Ätiologie, Diagnostik, konservative, interventionell endoskopische und operative Therapie der chronischen Pankreatitis. Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS). *Zeitschrift für Gastroenterologie*. 2012; 50: 1176–224.
20. **Dufour MC, Adamson MD.** The epidemiology of alcohol-induced pancreatitis. *Pancreas*. 2003; 27: 286–90.
21. **Apte MV, Wilson JS, McCaughan GW, Korsten MA, Haber PS, Norton ID, et al.** Ethanol-induced alterations in messenger RNA levels correlate with glandular content of pancreatic enzymes. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1995; 125: 634–40.
22. **Stevens T, Conwell DL, Zuccaro G.** Pathogenesis of chronic pancreatitis: An evidence-based review of past theories and recent developments. *The American journal of gastroenterology*. 2004; 99: 2256–70.
23. **Kloppel G, Maillet B.** Chronic pancreatitis: Evolution of the disease. *Hepato-gastroenterology*. 1991; 38: 408–12.
24. **Etemad B, Whitcomb DC.** Chronic pancreatitis: Diagnosis, classification, and new genetic developments. *Gastroenterology*. 2001; 120: 682–707.

25. **Schneider A, Lohr JM, Singer MV.** The M-ANNHEIM classification of chronic pancreatitis: Introduction of a unifying classification system based on a review of previous classifications of the disease. *Journal of gastroenterology*. 2007; 42: 101–19.
26. **Howes N, Lerch MM, Greenhalf W, Stocken DD, Ellis I, Simon P, et al.** Clinical and genetic characteristics of hereditary pancreatitis in Europe. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2004; 2: 252–61.
27. **Witt H, Luck W, Hennies HC, Classen M, Kage A, Lass U, et al.** Mutations in the gene encoding the serine protease inhibitor, Kazal type 1 are associated with chronic pancreatitis. *Nature genetics*. 2000; 25: 213–16.
28. **Cohn JA, Neoptolemos JP, Feng J, Yan J, Jiang Z, Greenhalf W, et al.** Increased risk of idiopathic chronic pancreatitis in cystic fibrosis carriers. *Human mutation*. 2005; 26: 303–07.
29. **Masson E, Chen J-M, Scotet V, Le Marechal C, Ferec C.** Association of rare chymotrypsinogen C (CTRC) gene variations in patients with idiopathic chronic pancreatitis. *Human genetics*. 2008; 123: 83–91.
30. **Fjeld K, Weiss FU, Lasher D, Rosendahl J, Chen J-M, Johansson BB, et al.** A recombined allele of the lipase gene CEL and its pseudogene CELP confers susceptibility to chronic pancreatitis. *Nature genetics*. 2015; 47: 518–22.
31. **Rosendahl J, Landt O, Bernadova J, Kovacs P, Teich N, Bodeker H, et al.** CFTR, SPINK1, CTRC and PRSS1 variants in chronic pancreatitis: Is the role of mutated CFTR overestimated? *Gut*. 2013; 62: 582–92.
32. **Sarles H, Sarles JC, Muratore R, Guien C.** Chronic inflammatory sclerosis of the pancreas--an autonomous pancreatic disease? *The American journal of digestive diseases*. 1961; 6: 688–98.
33. **Yoshida K, Toki F, Takeuchi T, Watanabe S, Shiratori K, Hayashi N.** Chronic pancreatitis caused by an autoimmune abnormality. Proposal of the concept of autoimmune pancreatitis. *Digestive diseases and sciences*. 1995; 40: 1561–68.
34. **Chari ST, Kloeppel G, Zhang L, Notohara K, Lerch MM, Shimosegawa T.** Histopathologic and clinical subtypes of autoimmune pancreatitis: The honolulu consensus document. *Pancreatology*. 2010; 10: 664–72.
35. **Chari ST.** Diagnosis of autoimmune pancreatitis using its five cardinal features: Introducing the Mayo Clinic's HISORt criteria. *Journal of gastroenterology*. 2007; 42 Suppl 18: 39–41.

36. **Matsubayashi H, Kakushima N, Takizawa K, Tanaka M, Imai K, Hotta K, et al.** Diagnosis of autoimmune pancreatitis. *World journal of gastroenterology*. 2014; 20: 16559–69.
37. **Stathis A, Moore MJ.** Advanced pancreatic carcinoma: Current treatment and future challenges. *Nature reviews. Clinical oncology*. 2010; 7: 163–72.
38. **Kamisawa T, Shimosegawa T, Okazaki K, Nishino T, Watanabe H, Kanno A, et al.** Standard steroid treatment for autoimmune pancreatitis. *Gut*. 2009; 58: 1504–07.
39. **Kamisawa T, Chari ST, Giday SA, Kim M-H, Chung JB, Lee KT, et al.** Clinical profile of autoimmune pancreatitis and its histological subtypes: An international multicenter survey. *Pancreas*. 2011; 40: 809–14.
40. **Shimosegawa T, Chari ST, Frulloni L, Kamisawa T, Kawa S, Mino-Kenudson M, et al.** International consensus diagnostic criteria for autoimmune pancreatitis: guidelines of the International Association of Pancreatology. *Pancreas*. 2011; 40: 352–58.
41. **Kanno A, Masamune A, Okazaki K, Kamisawa T, Kawa S, Nishimori I, et al.** Nationwide epidemiological survey of autoimmune pancreatitis in Japan in 2011. *Pancreas*. 2015; 44: 535–39.
42. **Schneider A, Michaely H, Weiss C, Hirth M, Ruckert F, Wilhelm TJ, et al.** Prevalence and Incidence of Autoimmune Pancreatitis in the Population Living in the Southwest of Germany. *Digestion*. 2017; 96: 187–98.
43. **Kloppel G, Detlefsen S, Chari ST, Longnecker DS, Zamboni G.** Autoimmune pancreatitis: The clinicopathological characteristics of the subtype with granulocytic epithelial lesions. *Journal of gastroenterology*. 2010; 45: 787–93.
44. **Ketwaroo GA, Sheth S.** Autoimmune pancreatitis. *Gastroenterology report*. 2013; 1: 27–32.
45. **Okazaki K, Uchida K, Sumimoto K, Mitsuyama T, Ikeura T, Takaoka M.** Autoimmune pancreatitis: pathogenesis, latest developments and clinical guidance. *Therapeutic advances in chronic disease*. 2014; 5: 104–11.
46. **Okazaki K, Tomiyama T, Mitsuyama T, Sumimoto K, Uchida K.** Diagnosis and classification of autoimmune pancreatitis. *Autoimmunity reviews*. 2014; 13: 451–58.
47. **Tsen A, Alishahi Y, Rosenkranz L.** Autoimmune Pancreatitis and Inflammatory Bowel Disease. *J Clin Gastroenterol*. 2016.
48. **Bozzalla Cassione E, Stone JH.** IgG4-related disease. *Current opinion in rheumatology*. 2017; 29: 223–27.



- 
49. **Pezzilli R, Pagano N.** Pathophysiology of autoimmune pancreatitis. *World journal of gastrointestinal pathophysiology*. 2014; 5: 11–17.
  50. **Bottazzi B, Doni A, Garlanda C, Mantovani A.** An integrated view of humoral innate immunity: Pentraxins as a paradigm. *Annual review of immunology*. 2010; 28: 157–83.
  51. **Meyer SI, Fuglsang K, Blaakaer J.** Cell-mediated immune response: A clinical review of the therapeutic potential of human papillomavirus vaccination. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*. 2014; 93: 1209–18.
  52. **Frulloni L, Lunardi C, Simone R, Dolcino M, Scattolini C, Falconi M, et al.** Identification of a novel antibody associated with autoimmune pancreatitis. *The New England journal of medicine*. 2009; 361: 2135–42.
  53. **Löhr J-M, Faissner R, Koczan D, Bewerunge P, Bassi C, Brors B, et al.** Autoantibodies against the exocrine pancreas in autoimmune pancreatitis: gene and protein expression profiling and immunoassays identify pancreatic enzymes as a major target of the inflammatory process. *The American journal of gastroenterology*. 2010; 105: 2060–71.
  54. **Taniguchi T, Okazaki K, Okamoto M, Seko S, Tanaka J, Uchida K, et al.** High prevalence of autoantibodies against carbonic anhydrase II and lactoferrin in type 1 diabetes: Concept of autoimmune exocrinopathy and endocrinopathy of the pancreas. *Pancreas*. 2003; 27: 26–30.
  55. **Okazaki K, Uchida K, Ohana M, Nakase H, Uose S, Inai M, et al.** Autoimmune-related pancreatitis is associated with autoantibodies and a Th1/Th2-type cellular immune response. *Gastroenterology*. 2000; 118: 573–81.
  56. **Okazaki K, Uchida K, Koyabu M, Miyoshi H, Takaoka M.** Recent advances in the concept and diagnosis of autoimmune pancreatitis and IgG4-related disease. *Journal of gastroenterology*. 2011; 46: 277–88.
  57. **Schwaiger T, van den Brandt C, Fitzner B, Zaatreh S, Kraatz F, Dummer A, et al.** Autoimmune pancreatitis in MRL/Mp mice is a T cell-mediated disease responsive to cyclosporine A and rapamycin treatment. *Gut*. 2014; 63: 494–505.
  58. **Fitzner B, Holzhueter S-A, Ibrahim S, Nizze H, Jaster R.** Interferon-Gamma Treatment Accelerates and Aggravates Autoimmune Pancreatitis in the MRL/Mp-Mouse. *Pancreatology*. 2009; 9: 233–39.
  59. **Zen Y, Fujii T, Harada K, Kawano M, Yamada K, Takahira M, et al.** Th2 and regulatory immune reactions are increased in immunoglobulin G4-related sclerosing pancreatitis and cholangitis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 2007; 45: 1538–46.

- 
60. **Vallance BA, Hewlett BR, Snider DP, Collins SM.** T cell-mediated exocrine pancreatic damage in major histocompatibility complex class II-deficient mice. *Gastroenterology*. 1998; 115: 978–87.
  61. **Emmrich J, Weber I, Nausch M, Sparmann G, Koch K, Seyfarth M, et al.** Immunohistochemical characterization of the pancreatic cellular infiltrate in normal pancreas, chronic pancreatitis and pancreatic carcinoma. *Digestion*. 1998; 59: 192–98.
  62. **Sparmann G, Behrend S, Merkord J, Kleine HD, Graser E, Ritter T, et al.** Cytokine mRNA levels and lymphocyte infiltration in pancreatic tissue during experimental chronic pancreatitis induced by dibutyltin dichloride. *Digestive diseases and sciences*. 2001; 46: 1647–56.
  63. **Fukumura Y, Takase M, Mitani K, Suda K, Imamhasan A, Nobukawa B, et al.** Amount of CD4+CD25+ regulatory T cells in autoimmune pancreatitis and pilonidal sinus. *Pancreas*. 2012; 41: 910–15.
  64. **Sallusto F, Lanzavecchia A.** Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *The Journal of experimental medicine*. 1994; 179: 1109–18.
  65. **Collin M, Bigley V.** Human dendritic cell subsets: An update. *Immunology*. 2018.
  66. **Liu YJ.** Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell*. 2001; 106: 259–62.
  67. **Schwarz H, Schmittner M, Duschl A, Horejs-Hoeck J.** Residual endotoxin contaminations in recombinant proteins are sufficient to activate human CD1c+ dendritic cells. *PloS one*. 2014; 9: e113840.
  68. **Arai Y, Yamashita K, Kuriyama K, Shiokawa M, Kodama Y, Sakurai T, et al.** Plasmacytoid Dendritic Cell Activation and IFN- $\alpha$  Production Are Prominent Features of Murine Autoimmune Pancreatitis and Human IgG4-Related Autoimmune Pancreatitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 2015; 195: 3033–44.
  69. **Davidson TS, Longnecker DS, Hickey WF.** An Experimental Model of Autoimmune Pancreatitis in the Rat. *The American Journal of Pathology*. 2005; 166: 729–36.
  70. **Sakaguchi Y, Inaba M, Tsuda M, Quan GK, Omae M, Ando Y, et al.** The Wistar Bonn Koberi rat, a unique animal model for autoimmune pancreatitis with extrapancreatic exocrinopathy. *Clinical and experimental immunology*. 2008; 152: 1–12.

71. **Boomershine CS, Chamberlain A, Kendall P, Afshar-Sharif A-R, Huang H, Washington MK, et al.** Autoimmune pancreatitis results from loss of TGFbeta signalling in S100A4-positive dendritic cells. *Gut*. 2009; 58: 1267–74.
72. **Seleznik GM, Reding T, Romrig F, Saito Y, Mildner A, Segerer S, et al.** Lymphotoxin beta receptor signaling promotes development of autoimmune pancreatitis. *Gastroenterology*. 2012; 143: 1361–74.
73. **Theofilopoulos AN, Eisenberg RA, Bourdon M, Crowell JS, JR, Dixon FJ.** Distribution of lymphocytes identified by surface markers in murine strains with systemic lupus erythematosus-like syndromes. *The Journal of experimental medicine*. 1979; 149: 516–34.
74. **Kanno H, Nose M, Itoh J, Taniguchi Y, Kyogoku M.** Spontaneous development of pancreatitis in the MRL/Mp strain of mice in autoimmune mechanism. *Clinical & Experimental Immunology*. 1992; 89: 68–73.
75. **Sorg H, Lorch B, Jaster R, Fitzner B, Ibrahim S, Holzhüeter S-A, et al.** Early rise in inflammation and microcirculatory disorder determine the development of autoimmune pancreatitis in the MRL/Mp-mouse. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*. 2008; 295: 80.
76. **Qu W-M, Miyazaki T, Terada M, Okada K, Mori S, Kanno H, et al.** A novel autoimmune pancreatitis model in MRL mice treated with polyinosinic:polycytidylic acid. *Clinical and experimental immunology*. 2002; 129: 27–34.
77. **Asghari F, Fitzner B, Holzhüter S-A, Nizze H, Castro Marques A de, Müller S, et al.** Identification of quantitative trait loci for murine autoimmune pancreatitis. *Journal of medical genetics*. 2011; 48: 557–62.
78. **Bischof J, Müller S, Borufka L, Asghari F, Möller S, Holzhüter S-A, et al.** Quantitative Trait Locus Analysis Implicates CD4+/CD44high Memory T Cells in the Pathogenesis of Murine Autoimmune Pancreatitis. *PloS one*. 2015; 10: e0136298.
79. **Borufka L, Volmer E, Müller S, Engelmann R, Nizze H, Ibrahim S, et al.** In vitro studies implicate an imbalanced activation of dendritic cells in the pathogenesis of murine autoimmune pancreatitis. *Oncotarget*. 2016; 7: 42963–77.
80. **Fujikado N, Saijo S, Yonezawa T, Shimamori K, Ishii A, Sugai S, et al.** Dcir deficiency causes development of autoimmune diseases in mice due to excess expansion of dendritic cells. *Nature medicine*. 2008; 14: 176–80.

81. **Koyabu M, Uchida K, Sakaguchi Y, Fukata N, Kusuda T, Miyoshi H, et al.** Possible Involvement of Foxp3(+) Regulatory T Cells in the Development of Immune-Mediated Pancreatitis in MRL/Mp Mice Treated with Polyinosinic:Polycytidylic Acid. *International journal of rheumatology*. 2013; 2013: 367325.
82. **Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie AL, Rossner S, Koch F, Romani N, et al.** An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *Journal of immunological methods*. 1999; 223: 77–92.
83. **Lapierre P, Béland K, Yang R, Alvarez F.** Adoptive transfer of ex vivo expanded regulatory T cells in an autoimmune hepatitis murine model restores peripheral tolerance. *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 2013; 57: 217–27.
84. **Ehlers L, Rohde S, Ibrahim S, Jaster R.** Adoptive transfer of CD3(+) T cells and CD4(+) CD44(high) memory T cells induces autoimmune pancreatitis in MRL/MpJ mice. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2018; 22: 2404–12.
85. **Frulloni L, Amodio A, Katsotourchi AM, Vantini I.** A practical approach to the diagnosis of autoimmune pancreatitis. *World journal of gastroenterology*. 2011; 17: 2076–79.
86. **Majumder S, Takahashi N, Chari ST.** Autoimmune Pancreatitis. *Digestive diseases and sciences*. 2017.
87. **Zhang J.** Yin and yang interplay of IFN-gamma in inflammation and autoimmune disease. *The Journal of clinical investigation*. 2007; 117: 871–73.
88. **Manetti R, Annunziato F, Tomasevic L, Gianno V, Parronchi P, Romagnani S, et al.** Polyinosinic acid: Polycytidylic acid promotes T helper type 1-specific immune responses by stimulating macrophage production of interferon-alpha and interleukin-12. *European journal of immunology*. 1995; 25: 2656–60.
89. **Chari ST, Smyrk TC, Levy MJ, Topazian MD, Takahashi N, Zhang L, et al.** Diagnosis of autoimmune pancreatitis: The Mayo Clinic experience. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2006; 4: 1010-6; quiz 934.
90. **Murphy ED RJB.** Autoimmunity and lymphoproliferation: induction by mutant gene *lpr*, and acceleration by a male-associated factor in strain BXSB mice. In: Rose NR, Bigazzi PE, Warner NL, editor. Genetic control of autoimmune disease.: New York: Elsevier North Holland; 1978. p. 207–20.

91. **Mattoo H, Mahajan VS, Maehara T, Deshpande V, Della-Torre E, Wallace ZS, et al.** Clonal expansion of CD4(+) cytotoxic T lymphocytes in patients with IgG4-related disease. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2016; 138: 825–38.
92. **Hajdu P, Chimote AA, Thompson TH, Koo Y, Yun Y, Conforti L.** Functionalized liposomes loaded with siRNAs targeting ion channels in effector memory T cells as a potential therapy for autoimmunity. *Biomaterials*. 2013; 34: 10249–57.
93. **Yamaki S, Ine S, Kawabe T, Okuyama Y, Suzuki N, Soroosh P, et al.** OX40 and IL-7 play synergistic roles in the homeostatic proliferation of effector memory CD4<sup>+</sup> T cells. *European journal of immunology*. 2014; 44: 3015–25.
94. **Moore TV, Clay BS, Ferreira CM, Williams JW, Rogozinska M, Cannon JL, et al.** Protective Effector Memory CD4 T Cells Depend on ICOS for Survival. *PloS one*. 2011; 6: e16529.
95. **Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A.** Central memory and effector memory T cell subsets: Function, generation, and maintenance. *Annual review of immunology*. 2004; 22: 745–63.
96. **Quah BJC, Parish CR.** The use of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) to monitor lymphocyte proliferation. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2010.
97. **Heib V, Sparber F, Tripp CH, Ortner D, Stoitzner P, Heufler C.** Cytip regulates dendritic-cell function in contact hypersensitivity. *European journal of immunology*. 2012; 42: 589–97.
98. **Panda SK, Kolbeck R, Sanjuan MA.** Plasmacytoid dendritic cells in autoimmunity. *Current Opinion in Immunology*. 2016; 44: 20–25.
99. **Okazaki K, Uchida K, Fukui T, Takaoka M, Nishio A.** Autoimmune pancreatitis--a new evolving pancreatic disease? *Langenbeck's archives of surgery*. 2010; 395: 989–1000.
100. **Taguchi M, Kihara Y, Nagashio Y, Yamamoto M, Otsuki M, Harada M.** Decreased production of immunoglobulin M and A in autoimmune pancreatitis. *Journal of gastroenterology*. 2009; 44: 1133–39.
101. **Kaluza KM, Vile R.** Improving the outcome of adoptive cell transfer by targeting tumor escape. *Oncoimmunology*. 2013; 2: e22059.
102. **Wada S, Yoshimura K, Hipkiss EL, Harris TJ, Yen H-R, Goldberg MV, et al.** Cyclophosphamide Augments Antitumor Immunity: Studies in an Autochthonous Prostate Cancer Model. *Cancer research*. 2009; 69: 4309–18.

103. **Hart MN, Tassell SK, Sadewasser KL, Schelper RL, Moore SA.** Autoimmune vasculitis resulting from in vitro immunization of lymphocytes to smooth muscle. *The American Journal of Pathology*. 1985; 119: 448–55.
104. **Detlefsen S, Sipos B, Zhao J, Drewes AM, Kloppel G.** Autoimmune pancreatitis: Expression and cellular source of profibrotic cytokines and their receptors. *The American journal of surgical pathology*. 2008; 32: 986–95.
105. **Lande R, Ganguly D, Facchinetti V, Frasca L, Conrad C, Gregorio J, et al.** Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Science translational medicine*. 2011; 3: 73ra19.

## 7. Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

µg	-	Mikrogramm
µl	-	Mikroliter
µm	-	Mikrometer
µM	-	Mikromolar
AG(s)	-	Antigen(e)
AIL	-	<i>Advanced Intercross Line</i>
AIP	-	Autoimmunpankreatitis
AK(s)	-	Antikörper
ANAs	-	antinukleäre Antikörper
AP	-	akute Pankreatitis
APC	-	Allophycocyanin (Farbstoff Durchflusszytometrie)
bzw.	-	beziehungsweise
ca.	-	<i>circa</i>
CD	-	<i>cluster of differentiation</i>
CDKN2A	-	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
CEL	-	<i>carboxylester-lipase</i>
CFSE	-	Carboxy-Fluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester
CFTR	-	<i>cystic-fibrosis-transmembrane-conductance-regulator</i>
CLEC4A2	-	<i>C-type lectin domain family 4, member a2 gene</i>
cm <sup>2</sup>	-	Quadratzentimeter
CP	-	chronische Pankreatitis
CTL	-	<i>cytotoxic T-lymphocytes</i> , zytotoxische T-Lymphozyten
CTLA4	-	<i>cytotoxic T-Lymphocyte-associated protein 4</i> , CTL-assoziiertes Protein
CTRC	-	Chymotrypsin-C
CYTIP	-	<i>cytohesin-interacting protein</i>

---

DNA	-	Desoxyribonukleinsäure
DNase	-	Desoxyribonuklease I
DZ(s)	-	dendritische Zelle(n)
EDTA	-	Ethylendiamintetraacetat
EU	-	Europäische Union
FITC	-	Fluoresceinisothiocyanat (Farbstoff Durchflusszytometrie)
FKS	-	fetales Kälberserum
FoxP3	-	<i>Forkhead-Box-Protein P3</i>
g	-	<i>g</i> -Kraft
GELs	-	<i>granulocytic epithelial lesions</i> , granulozytäre Infiltrate in Gängen
GM-CSF	-	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> , Granulozyten-Makrophagen-stimulierender Faktor
GTPase	-	Guaninnukleotid-bindendes Protein
h	-	Stunde(n)
H&E	-	Hämatoxylin & Eosin (Histologische Färbemethode)
HISORt	-	<i>histology, imaging, serology, other organ involvement and response to steroid therapy</i> (Diagnose-Kriterien für AIP)
IDCP	-	<i>idiopathic duct-centric pancreatitis</i> , idiopathisch gangzentrierte Pankreatitis
IFN-x	-	Interferon-x
Ig	-	Immunglobulin
IgG4-RD	-	<i>IgG4-related disease</i> , IgG4-assoziierte Erkrankung
IHC	-	Immunhistochemie
IL-x	-	Interleukin-x
IPMN	-	intraduktale papillär-muzinöse Neoplasien
kDZs	-	konventionelle DZs
kg	-	Kilogramm
KM	-	Knochenmark



---

KRAS	-	<i>v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LPS	-	Lipopolysaccharid
LPSP	-	lymphoplasmazytäre sklerosierende Pankreatitis
M	-	Molar
MACS	-	<i>magnetic-activated cell sorting</i> <sup>®</sup>
M-ANNHEIM	-	Klassifikation CP: <u>m</u> ultiple Risikofaktoren: <u>A</u> lkohol, <u>N</u> ikotin, <u>n</u> utritive Faktoren, <u>h</u> ereditäre Faktoren, Faktoren der <u>e</u> fferenten Gangsysteme, <u>i</u> mmunologische Faktoren und <u>m</u> etabolische Faktoren
mg	-	Milligramm
MHC-II	-	<i>major histocompatibility complex II</i>
min	-	Minute(n)
ml	-	Milliliter
mm	-	Millimeter
mTOR	-	<i>machanistic Target of Rapamycin</i> , Ziel des Rapamycin (im Säugetier)
MZN	-	muzinös-zystische Neoplasie
NETs	-	<i>neutrophile extracellular traps</i> , Neutrophile Extrazelluläre Fallen
ng	-	Nanogramm
p14ARF	-	(Protein)
p16	-	(Protein)
p53	-	(Protein)
PANINs	-	<i>pancreatic intraepithelial neoplasia</i>
PBP	-	Plasminogen-Bindungsprotein
PBS	-	<i>phosphate buffered saline</i>
PDAC	-	pankreatisches duktales Adenokarzinom
pDZs	-	plasmazytoide DZs
PE	-	Phycoerythrin (Farbstoff Durchflusszytometrie)
PHA	-	Phytohämagglutinin
Poly I:C	-	<i>polyinosinic:polycytidylic</i> Säure

---

PRSS1	-	kationisches Trypsinogen (auch Serinprotease 1)
QTLs	-	<i>Quantitative Trait Loci</i> (QTL - Singular, <i>Quantitative Trait Locus</i> )
RNA	-	Ribonukleinsäure
RPMI	-	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (Bezeichnung für Zellkulturmedium)
RT	-	Raumtemperatur
s.	-	siehe
sek	-	Sekunden
SEM	-	<i>standard error of mean</i>
SMAD4	-	<i>mothers against decapentaplegic homolog 4</i>
SPINK1	-	Serinprotease-Inhibitor, Kazal-Typ-1
T <sub>CM</sub>	-	<i>central memory T-cells</i> , zentrale Gedächtnis-T-Zellen
T <sub>EM</sub>	-	<i>effector memory T-cells</i> , Effektor-Gedächtnis-T-Zellen
TGF- $\beta$	-	<i>transforming growth factor <math>\beta</math></i>
Th0	-	naïve T-Zelle
Th1/2	-	T-Helferzellen Typ 1/2
TIGAR-O	-	Klassifikation CP: <u>T</u> oxisch-metabolisch, <u>I</u> diopathisch, <u>G</u> enetisch, <u>A</u> utoimmun, <u>R</u> ezidivierende AP, <u>O</u> bstruktiv
TLR3	-	<i>toll-like receptor</i> , Toll-ähnlicher Rezeptor
TNF- $\alpha$	-	<i>tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i> , Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TP53	-	<i>tumor protein p53</i> (Gen)
T <sub>regs</sub>	-	regulatorische T-Zellen
U	-	<i>unit</i> (Einheit)
UBR2	-	Ubiquitin Protein Ligase E3 Komponente N-Recognin 2
USA	-	<i>United States of America</i>
z.B.	-	zum Beispiel

## 7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Einige Charakteristika von AIP Typ 1 und Typ 2 (modifiziert nach [45]).	8
Tabelle 2. Eigenschaften der Transfergruppen.	19
Tabelle 3. Färbeansätze der verschiedenen Zellpopulationen für durchflusszytometrische Messungen.	26
Tabelle 4. Ablauf der H&E-Färbung.	29
Tabelle 5. Auflistung aller benutzten Geräte.	VI
Tabelle 6. Auflistung aller Verbrauchsmaterialien.	VII
Tabelle 7. Auflistung aller verwendeten Substanzen, Lösungen und Puffer.	VIII

## 7.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Hypothese über die Pathogenese der AIP (modifiziert nach [45]).	11
Abbildung 2. Zeitlicher Ablauf der Zelltransferexperimente	18
Abbildung 3. Beispielhafte Aufnahmen H&E-gefärbter Pankreata von Spendertieren mit H&E-Scores von 1-4	34
Abbildung 4. Reinheit der isolierten T-Zellpopulationen.	36
Abbildung 5. Reinheit der <i>in vitro</i> generierten DZs aus KM	37
Abbildung 6. AIP-Scores der Empfängertiere nach dem Transfer von Milzzellen, CD3 <sup>+</sup> , CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> und CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T-Zellen	39
Abbildung 7. AIP-Scores der Empfängertiere nach dem Transfer von Milzzellen und CD4 <sup>+</sup> CD44 <sup>high</sup> T-Zellen	41
Abbildung 8. Zusammensetzung der Immunzellinfiltrate der Empfängertiere nach dem Transfer verschiedener Zellpopulationen	43
Abbildung 9. Vorhandensein von Immunzellinfiltraten in Lebern und Nieren der Empfängertiere von Milzzellen und CD3 <sup>+</sup> T-Zellen	44
Abbildung 10. AIP-Scores der Empfängertiere nach dem Transfer von CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> T <sub>regs</sub>	45
Abbildung 11. AIP-Scores der Empfängertiere nach dem Transfer von DZs	47
Abbildung 12. Erweiterung des Konzepts der Immunpathogenese der AIP (modifiziert nach [45])	62

## 7.4 Materialien

### 7.4.1 Geräte

**Tabelle 5. Auflistung aller benutzten Geräte.**

Gerätebezeichnung	Gerätename	Seriennummer	Hersteller
Abzug	-	-	Köttermann GmbH&Co.KG
Chemikalienschrank	-	43829_HePi_1	Düperthal Sicherheitstechnik GmbH&Co.KG
CO <sub>2</sub> -Inkubator	HERAcell <sup>®</sup> 150	40862222	Thermo Electron Corporation
Durchflusszytometer	FACSCalibur <sup>™</sup>	E97500003	BD Biosciences
Durchflusszytometer	FACSVerse <sup>™</sup>	Z6511540325	BD Biosciences
Durchlichtmikroskop	Axiophot	45 18 89	Carl Zeiss AG
Durchlichtmikroskop	Axiovert 25 C	667 234	Carl Zeiss AG
Einbettautomat	HistoStar <sup>™</sup>	-	MICROM International GmbH
Eisflockenmaschine	AF 103	3006 ES1L	Scotsman
FACStation (Software)	CellQuestPro	OS10.2.6	BD Biosciences
Feinanalysenwaage	JL-200	-	Chao Balance Corp.
Histokinetten	STP 120	58599	MICROM International GmbH
Kamera	AxioCamICc1	09/285847905	Carl Zeiss AG
Kryostat	Leica CM1850	-	Leica Biosystems Nussloch GmbH
Kühl-Gefrierkombi	LCv 4010	81.881.948.1	Liebherr-International Deutschland GmbH
Kühlschrank, -20 °C	GNP 2356	49.128.888.8	Liebherr-International Deutschland GmbH
Kühlschrank, 4 °C	KT 1520	16.462.207.0	Liebherr-International Deutschland GmbH
Kühlschrank, 4 °C	UKS 5002	78.774.603.0	Liebherr-International Deutschland GmbH
Kühlschrank, -80 °C	HFU B Series	840367-166	Thermo Fisher Scientific Inc.
Kühlschrank, -80 °C	HFU 586 Basic	51014673	Heraeus Holding GmbH
Kühltruhe, -150 °C	MDF-C2156VAN	60915116	Sanyo Denki K.K.
MACSiMAG <sup>™</sup> Separator	-	130-092-168	Miltenyi Biotech GmbH
Mikroskop	Axio Observer	1027184678	Carl Zeiss AG
Mikroskopie-Software	Zen 2 (blue edition)	2.3	Carl Zeiss AG
Mikrotom	Hyrax M55	-	Carl Zeiss AG
Mikrotom	HM 340 E	58353	MICROM International GmbH
MiniMACS <sup>™</sup> Separator	-	130-042-102	Miltenyi Biotech GmbH
Mini-Trockenofen	Hybrid2	265	Appligene Oncor S.A.
QuadroMACS <sup>™</sup> Separator	-	130-090-976	Miltenyi Biotech GmbH
Sicherheitswerkbank	-	16047.3	Kojair Tech Oy
Software	FACSuite	V1.0.6.5230	BD Biosciences
SPSS-Software	SPSS Statistics	Version 22	IBM Corp.
Trockenschrank	EU280 Elect/IS	39501259	Jouan
Vortexer	VF2	-	IKA <sup>®</sup> -Werke GmbH&Co.KG
Waage	FA-2000	5230 586	A&D Company
Zentrifuge	Rotina 46 R	0003058-01-00	Andraes Hettich GmbH&Co.KG
Zentrifuge	Mikro 200 R	0000778-02-00	Andraes Hettich GmbH&Co.KG

## 7.4.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 6. Auflistung aller Verbrauchsmaterialien.

Materialname	Spezifikation	Katalognummer	Hersteller
Cryomold®	Intermediate	4566	Sakura Finetek Europe E.V.KvK
Deckgläschen	24x50 mm	631-0146	Menzel-Gläser
End-to-End Kapillare	20 µl, K2E	19.447	Sarstedt AG&Co.KG
Feindosierungsspritze, 1 ml	Omnican®-F	9161502V	B. Braun Melsungen AG
Gewebekassetten	Histosette® I	M499	Simport Scientific Inc.
Gewebeschälchen	-	632181	Greiner Bio One Int. GmbH
Handschuhe, XS	PehaSoft®, Nitril	11000000276	Zentralapotheke UMR
Insulinspritzen	MicroFine™+	324826	BD Biosciences
Knülen	20G x 1/2“	301300	BD Biosciences
Knülen	22G x 1/4“	301900	BD Biosciences
Knülen	26G x 1/2“	301800	BD Biosciences
Kryoröhrchen, 2 ml	-	72.379	Sarstedt AG&Co.KG
Mikrotiterplatte, 24 well	-	662 160	Greiner Bio One Int. GmbH
Mikrotiterplatte, 6 well	-	657 160	Greiner Bio One Int. GmbH
Neubauerzählkammer	Neubauer improved	0640010	Paul Marienfeld GmbH&Co.KG
Objektträger, adhäsiv	HistoBond®	0810000	Paul Marienfeld GmbH&Co.KG
Präzisionstücher	weiß/ klein	7552	Kimberly-Clark Corp.
Reaktionsgefäße, 1,3 ml	<i>Clot activator</i>	14.1501.005	Sarstedt AG&Co.KG
Reaktionsgefäße, 0,6 ml	Farbig	710108	Biozym Scientific GmbH
Röhrchen, 15 ml	PP, steril	188 271	Greiner Bio One Int. GmbH
Röhrchen, 5 ml	für FACS	55.1579	Sarstedt AG&Co.KG
Röhrchen, 50 ml	PP, steril	227 261	Greiner Bio One Int. GmbH
Safe-Lock Tubes, 1,5 ml	Farblos	0030120086	Eppendorf AG
Safe-Lock Tubes, 2 ml	Farblos	0030120094	Eppendorf AG
Säulen, LD	-	130-042-901	Miltenyi Biotech GmbH
Säulen, LS	-	130-042-401	Miltenyi Biotech GmbH
Säulen, MS	-	130-042-201	Miltenyi Biotech GmbH
Spritzen, 1 ml	Omnifix®-F	9161406V	B. Braun Melsungen AG
Spritzen, 5 ml	Omnifix® Solo	4617053V	B. Braun Melsungen AG
Spritzen, 10 ml	Discardit® II	309110	BD Biosciences
Zellkulturflaschen, 250 ml	75 cm <sup>2</sup>	658 170	Greiner Bio One Int. GmbH
Zellsieb, 40 µm	<i>Easystrainer</i>	542 040	Greiner Bio One Int. GmbH
Zellsieb, 70 µm	<i>Easystrainer</i>	542 070	Greiner Bio One Int. GmbH

7.4.3 Substanzen, Lösungen und Puffer**Tabelle 7. Auflistung aller verwendeten Substanzen, Lösungen und Puffer.**

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller	Anmerkung
10 x PBS	1:10 Verdünnung mit destilliertem Wasser	gibco®	pH 7,4
AK: anti-CD11c	APC, mouse	Miltenyi Biotec GmbH	Katalognr.: 130-102-493
AK: anti-CD11c	FITC, mouse	Miltenyi Biotec GmbH	Katalognr.: 130-102-466
AK: anti-CD19	FITC, mouse	Miltenyi Biotec GmbH	Katalognr.: 130-092-042
AK: anti-CD25	APC, mouse	Miltenyi Biotec GmbH	Katalognr.: 130-108-997
AK: anti-CD3	anti-mouse, IHC	BD Biosciences	Katalognr.: 555273
AK: anti-CD3	FITC, mouse	Miltenyi Biotec GmbH	Katalognr.: 130-102-496
AK: anti-CD4	anti-mouse, IHC	ImmunoTools GmbH	Katalognr.: 22150041
AK: anti-CD4	FITC, mouse	Miltenyi Biotec GmbH	Katalognr.: 130-102-541
AK: anti-CD4	PE, mouse	Miltenyi Biotec GmbH	Katalognr.: 130-102-619
AK: anti-CD40	PE, mouse	Miltenyi Biotec GmbH	Katalognr.: 130-102-599
AK: anti-CD44	anti-mouse, IHC	eBioscience	Katalognr.: 14-0441-81
AK: anti-CD44	APC, mouse	Miltenyi Biotec GmbH	Katalognr.: 130-102-563
AK: anti-CD62L	PE, mouse	Miltenyi Biotec GmbH	Katalognr.: 130-112-835
AK: anti-CD8	PE, mouse	Miltenyi Biotec GmbH	Katalognr.: 130-102-595
AK: anti-CD80	PE, mouse	Miltenyi Biotec GmbH	Katalognr.: 130-102-613
AK: anti-CD83	PE, mouse	Miltenyi Biotec GmbH	Katalognr.: 130-104-474
AK: anti-CD86	APC, mouse	Miltenyi Biotec GmbH	Katalognr.: 130-102-558
AK: anti-CD8β	anti-mouse, IHC	Santa Cruz Biotechnology Inc.	Katalognr.: sc-20041
AK: anti-FoxP3	PE, mouse	Miltenyi Biotec GmbH	Katalognr.: 130-111-678
AK: anti-MHC-II	APC, mouse	Miltenyi Biotec GmbH	Katalognr.: 130-102-139
AK: anti-rat IgG (H+L)	made in goat, biotinylated	Biozol Diagnostika Vertrieb GmbH	Katalognr.: VEC-BA-9400
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	0,25 M	Sigma-Aldrich Corp.	Katalognr.: A0717
autoMACS®-running buffer	MACS Separation Buffer	Miltenyi Biotec GmbH	-
Avidin/Biotin Blocking Kit	-	Vector Laboratories Inc.	Katalognr.: SP-2001
CD4 <sup>+</sup> T Cell Isolation Kit	mouse	Miltenyi Biotec GmbH	Katalognr.: 130-096-533
CD4 <sup>+</sup> /CD62L <sup>+</sup> /CD44 high Memory T Cell Column Kit	mouse	R&D Systems Inc.	Katalognr.: MCD44
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Regulatory T Cell Isolation Kit	mouse	Miltenyi Biotec GmbH	Katalognr.: 130-091-041
CD8a <sup>+</sup> T Cell Isolation Kit	mouse	Miltenyi Biotec GmbH	Katalognr.: 130-104-075
Cyclophosphamid	-	Baxter Deutschland GmbH	Pzn: 7118354
destilliertes Wasser	-	-	-
DNAse I	grade II, from bovine pancreas	F. Hoffmann-La Roche Ltd	Katalognr.: 10104159001 Roche
Eosin	0,2 %, alkoholisch	Medite GmbH	Katalognr.: 41-6600-00
Erythrozytenlysepuffer (1000ml)	0,839 g NaHCO <sub>3</sub> 8,29 g NH <sub>4</sub> Cl 0,037 g Na <sub>2</sub> EDTA	Sigma-Aldrich Corp. Sigma-Aldrich Corp. Sigma-Aldrich Corp.	pH 7,3
Essigsäure	100 %	J.T. Baker™	glazial

Ethanol, 96 %	-	Zentralapotheke UMR	vergällt
Ethanol, absolut	-	Zentralapotheke UMR	unvergällt
FcR <i>blocking reagent</i>	anti-mouse CD16/32	BioLegend Inc.	Katalognr.: 130-059-901
Formalin „Formafix“	-	Zentralapotheke UMR	4 %
FoxP3 Staining Buffer Set	-	Miltenyi Biotec GmbH	Katalognr.: 130-093-142
GM-CSF	rekombinant, murin	ImmunoTools GmbH	Katalognr.: 12343125
Goat-Serum	in PBS	Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH	2 %
Hämatoxylin nach Harris/ Gill II	1:5 Verdünnung mit destilliertem Wasser	Medite GmbH	-
Histoplast-Paraffin	-	Fischer Scientific GmbH	Katalognr.: 8331
IL-2	rekombinant, murin	ImmunoTools GmbH	Katalognr.: 12340026
Ketamin	500 mg/10 ml	ratiopharm GmbH	Pzn: 7538814
LPS	-	Sigma-Aldrich Corp.	Katalognr.: L4391-1MG
Mayers Hämalunlösung	-	Merck KGaA	Katalognr.: 1.092.490.500
Methanol	-	Zentralapotheke UMR	-
Pan T Cell Isolation Kit II	mouse	Miltenyi Biotec GmbH	Katalognr.: 130-095-130
Pertex	-	Medite GmbH	Katalognr.: 41-4011-00
PHA	-	Sigma-Aldrich Corp.	Katalognr.: L2646-10MG
Tissue-Tek®	-	Sakura Finetek Europe	Katalognr.: 4583
Treg Expansion Kit	mouse	Miltenyi Biotec GmbH	Katalognr.: 130-095-925
Trypanblau	-	Sigma-Aldrich Corp.	Katalognr.: 93595
Vectastain® ABC Kit	-	Vector Laboratories Inc.	Katalognr.: PK-4000
Xylazin	2 % Bernburg	MEDISTAR Arzneimittelvertrieb GmbH	Pzn: 07099786
Xylol	-	Zentralapotheke UMR	-
Zellkulturmedium	RPMI-1640 FKS Penicillin/ Streptomycin B-Mercaptoethanol	Biochrom GmbH PAA Laboratories GmbH PAA Laboratories GmbH Sigma-Aldrich Corp.	- 10 % 1 % 50 µM

## 7.5 Curriculum Vitae

### Persönliche Daten

Name: Luise Ehlers (geb. Borufka)  
Anschrift: Hartestraße 4  
18055 Rostock  
Staatsangehörigkeit: Deutsch  
Geburtsdatum / -ort: 08.07.1990 / Halle (Saale)

### Akademische Laufbahn

Schule: September 1997 – Juli 2001  
Grund- und Realschule Plate  
September 2001 – Juli 2009  
Gymnasium am Sonnenberg, Crivitz (Abitur: 1,0)  
Sonstiges Schule: August 2006 – Juni 2007  
Schüleraustausch in Sierra Vista, Arizona, USA (10. Klasse)  
April – Juli 2009  
Teilnahme am Juniorstudium der Universität Rostock (Chemie)  
Äquivalenzbescheinigung für das Große Latinum  
Universität: Oktober 2009 – Juli 2012  
Universität Rostock  
Medizinische Biotechnologie – Bachelor of Science (2,0)  
(Bachelorarbeit: „*Cellular effects of nanostructured charcoal absorbent treatment of human serum albumin solutions*“)  
Oktober 2012 – März 2015  
Universität Rostock  
Medizinische Biotechnologie – Master of Science (1,4)  
(Masterarbeit: „*Involvement of Dendritic Cells in the Pathogenesis of Murine Autoimmune Pancreatitis*“)



- Promotion: seit April 2015  
Zentrum für Innere Medizin, Klinik II, Abteilung für  
Gastroenterologie, Endokrinologie und  
Stoffwechselkrankheiten, Universitätsmedizin Rostock
- Praktika: August – September 2011  
Albutec GmbH, Rostock  
in-vitro Experimente zum Thema Albumindialyse
- Mai – August 2014  
*Department of Clinical Science, Division of Infection Medicine,*  
BMC, Universität Lund, Schweden  
Thema: „*Structure and Function of Aminopeptidase N (PepN)*  
*from Streptococcus pyogenes*”  
gefördert durch ein Stipendium der Universität Lund
- März – April 2015  
Teilnahme am Versuchstierkunde-Basiskurs (Schwerpunkt  
Maus/Ratte) nach FELASA B-Richtlinien  
(erfolgreicher Abschluss)

## 7.6 Liste der Publikationen und Fachvorträge auf Tagungen

### Eigene Publikationen

- Dominik A, Stange J, Pfensig C, **Borufka L**, Weiss-Reining H, Eggert M. Reduction of elevated cytokine levels in acute/acute-on-chronic liver failure using super-large pore albumin dialysis treatment: an in vitro study. *Ther Apher Dial*. 2014; 347-52.
- Bischof J, Müller S, **Borufka L**, Asghari F, Möller S, Holzhüter SA, *et al*. Quantitative Trait Locus Analysis Implicates CD4<sup>+</sup>/CD44<sup>high</sup> Memory T Cells in the Pathogenesis of Murine Autoimmune Pancreatitis. *PloS one*. 2015; 10: e0136298.
- **Borufka L**, Volmer E, Müller S, Engelmann R, Nizze H, Ibrahim S, *et al*. In vitro studies implicate an imbalanced activation of dendritic cells in the pathogenesis of murine autoimmune pancreatitis. *Oncotarget*. 2016; 7: 42963–77.
- Pfensig C, Dominik A, **Borufka L**, Hinz M, Stange J, Eggert M. A New Application for Albumin Dialysis in Extracorporeal Organ Support: Characterization of a Putative Interaction Between Human Albumin and Proinflammatory Cytokines IL-6 and TNF $\alpha$ . *Artif Organs*. 2016; 397-402.
- Rohde S, Lindner T, Polei S, Stenzel J, **Borufka L**, Achilles S, *et al*. Application of in vivo imaging techniques to monitor therapeutic efficiency of PLX4720 in an experimental model of microsatellite instable colorectal cancer. *Oncotarget*. 2017; 8: 69756–67.
- Wallbaum P, Rohde S, **Ehlers L**, Lange F, Hohn A, Bergner C, *et al*. Antifibrogenic effects of vitamin D derivatives on mouse pancreatic stellate cells. *World J Gastroenterol*. 2018; 24: 170-8.
- **Ehlers L**, Rohde S, Ibrahim SM, Jaster R. Adoptive transfer of CD3<sup>+</sup> T-cells and CD4<sup>+</sup>CD44<sup>high</sup> memory T-cells induces autoimmune pancreatitis in MRL/MpJ mice. *J Cel Mol Med*. 2018; 22: 2404-12.

### Fachvorträge

- **Borufka L**, Volmer E, Müller S, Ibrahim SM, Jaster R. In vitro und in vivo Studien zur Immunpathogenese der murinen Autoimmunpankreatitis. 36. Jahrestagung des Deutschen Pankreasclub (DPC), 18.-20.01.2016, Freising, Deutschland (**Posterpräsentation**).
- **Borufka L**, Volmer E, Müller S, Ibrahim SM, Jaster R. In vitro und in vivo Studien zur Immunpathogenese der murinen Autoimmunpankreatitis. 71. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS), 21.-24.09.2016, Hamburg, Deutschland (**Fachvortrag, Otto-Porges-Preisträgerin**).

- **Borufka L**, Volmer E, Müller S, Engelmann R, Nizze H, Ibrahim SM, *et al.* Functional Studies Implicate an Imbalanced Activation of Dendritic Cells in the Pathogenesis of murine Autoimmune Pancreatitis. 47. Jahrestagung der American Pancreatic Association (APA), 26.-29.10.2016, Boston, USA (**Posterpräsentation**).
- **Borufka L**, Müller S, Jaster R. Übertragung der murinen Autoimmunpankreatitis durch Subpopulationen von Lymphozyten. 37. Jahrestagung des DPC, 26.-28.01.2017, Greifswald, Deutschland (**Fachvortrag**, bester Nachwuchsvortrag).
- **Borufka L**, Müller S, Jaster R. Autoimmune pancreatitis of MRL/Mp mice is triggered by different subtypes of activated T-cells. 49. Jahrestagung des Europäischen Pankreasclub (EPC), 28.06.-01-07.2017, Budapest, Ungarn (**Posterpräsentation**).
- **Ehlers L**, Rohde S, Ibrahim SM, Gupta Y, Kahraman A, Schneider A, *et al.* Genetische und immunologische Grundlagen der Autoimmunpankreatitis. 38. Jahrestagung des DPC, 25.-27.01.2018, Ulm, Deutschland (**Fachvortrag**).

#### veröffentliche Abstracts

- **Borufka L**, Volmer E, Müller S, Ibrahim SM, Jaster R. In vitro und in vivo Studien zur Immunpathogenese der murinen Autoimmunpankreatitis. *Z Gastroenterologie*. 2016; 54: KV461. *Meeting Abstract (DGVS 2016)*.
- **Borufka L**, Volmer E, Müller S, Engelmann R, Nizze H, Ibrahim SM, *et al.* Functional Studies Implicate an Imbalanced Activation of Dendritic Cells in the Pathogenesis of murine Autoimmune Pancreatitis. *Pancreas*. 2016; 45: 1498. *Meeting Abstract (APA 2016)*.
- Jaster R, Müller S, **Borufka L**, Bischof J, Gupta Y, Asghari F, *et al.* Susceptibility Genes of Murine Autoimmune Pancreatitis. *Pancreas*. 2016; 45: 1512-13. *Meeting Abstract (APA 2016)*.
- **Borufka L**, Müller S, Jaster R. Autoimmune pancreatitis of MRL/Mp mice is triggered by different subtypes of activated T-cells. *Pancreatology*. 2017; 17: S2. *Meeting Abstract (EPC 2017)*.

## **7.7 Danksagung**

Ich möchte an dieser Stelle die Möglichkeit nutzen, mich bei allen Menschen zu bedanken, die mich in den letzten Jahren unterstützt und so durch die Promotion begleitet haben.

Mein erster großer Dank gebührt dabei meinem Doktorvater Prof. Dr. Robert Jaster. Durch ihn wurde ich bereits in der Masterarbeit an dieses spannende Thema herangeführt. Bedanken möchte ich mich für die Möglichkeit der Promotion, die hervorragenden Arbeitsbedingungen und die ausgezeichnete Betreuung. Besonders freue ich mich auch über die Erfahrungen, die ich durch die wiederholte Teilnahme an nationalen und internationalen Kongressen sammeln durfte. Auch für die tatkräftige Unterstützung bei der Laborarbeit sowie die Geduld beim Korrekturlesen der Manuskripte danke ich vielmals. Und nicht zuletzt bedanke ich mich für die Offenheit, das Vertrauen und den freundlichen Umgang im täglichen Laboralltag.

Dr. Sarah Rohde möchte ich für die tatkräftige Unterstützung besonders in der Anfangszeit der Experimente danken und für die vielen fachlichen und persönlichen Gespräche, die mir eine große Unterstützung waren.

Katja Bergmann danke ich für die gemeinsame Arbeit im Labor, das ohne sie niemals laufen würde, die Unterstützung bei allen kleinen Dingen und die vielen Gespräche. Auch allen anderen Mitarbeitern des Forschungslabors danke ich für zahlreichen Anregungen und das freundschaftliche Miteinander. Den Mitarbeitern der Core Facility Zentrale Versuchstierhaltung der Universitätsmedizin Rostock, besonders Ilona Klamfuß, danke ich für die Hilfe und Unterstützung bei den Tierversuchen.

Ein großes Dankeschön gilt auch allen meinen Freunden, besonders Anna, Margit und Anni. Nur durch ihre offenen Ohren für alle kleinen und großen Probleme, die zahlreichen schönen Ablenkungen und auch die vielen ruhigen Abende hatte ich in den letzten Jahren den nötigen Ausgleich zur Arbeit. Vor allem möchte ich Maike danken. Danke dafür, dass wir es trotz der Entfernung geschafft haben und für die vielen langen Gespräche, in denen sie es immer wieder geschafft hat, mich zum Lachen zu bringen.

Von Herzen möchte ich mich auch bei meinen Eltern, meinem Bruder Felix und meiner gesamten Familie bedanken. Dankeschön für die grenzenlose Unterstützung und die bedingungslosen Aufmunterungen zu jeder Tages- und Nachtzeit.

Ganz besonders danke ich Christian, der immer für mich da ist, stets an mich glaubt und mir den Rücken frei hält. Ohne ihn wäre ich oft verzweifelt. Ich freue mich auf unsere gemeinsame Zukunft.

## 7.8 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Thema:

**„Tierexperimentelle Studien zur Übertragung der murinen Autoimmunpankreatitis durch adoptiven Zelltransfer“**

selbstständig verfasst und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen benutzt habe. Die Stellen, die anderen Werken dem Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, habe ich in jedem einzelnen Fall durch Angaben der Quellen kenntlich gemacht.

Ich erkläre hiermit weiterhin, dass ich meine wissenschaftlichen Arbeiten nach den Prinzipien der guten wissenschaftlichen Praxis gemäß der gültigen „Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zur Vermeidung Fehlverhaltens“ an der Universität Rostock angefertigt habe.

Rostock, April 2018

---

Luise Ehlers